

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

29 March 2001 (29.03.01)

International application No.:

PCT/JP00/06511

Applicant's or agent's file reference:

C1-109PCT

International filing date:

22 September 2000 (22.09.00)

Priority date:

22 September 1999 (22.09.99)

Applicant:

MIYASAKA, Nobuyuki et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

22 September 2000 (22.09.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



117  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C1-109PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06511	International filing date (day/month/year) 22 September 2000 (22.09.00)	Priority date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C12Q 1/68, C12N 9/12, C07K 14/47, A61K 45/00, 38/17, A61P 29/00, 19/02, 43/00, G01N 33/50, 33/15		
Applicant MIYASAKA, Nobuyuki		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>        </u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 22 September 2000 (22.09.00)	Date of completion of this report 23 March 2001 (23.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06511

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/06511

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: WO, 97/27297, A (Mitotix Inc.), 31 July 1997 (31.07.97) & JP, 11-509739, A & US, 5672508, A & AU, 700847, B & AU, 1747397, A & CA, 2242960, A & EP, 877804, A

Document 2: J. W. Harper et al., "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases", Cell (1993), Vol. 75, No. 4, pp. 805-816

**Claims 1-8**

Document 1 discloses use of fusion proteins of protein inhibitors of cyclin-dependent kinase such as p21/Cip1 for the treatment of inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis.

Document 2 discloses p21/Cip1 as an inhibitor of cyclin-dependent kinase and presents the DNA sequence and amino acid sequence of p21/Cip1.

A person skilled in the art could easily conceive of using a cyclin-dependent kinase inhibitor to control rheumatoid arthritis - an inflammatory condition of periostial tissue - as disclosed in Document 1, and the use of p21/Cip1 protein or DNA encoding said protein as disclosed in Document 2 for screening compounds which provoke an increase in p21/Cip1 protein for this purpose





**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

national application No.

PCT/JP 00/06511

is also a routine option available to a person skilled in the art.

Therefore, the inventions described in Claims 1-8 could be derived easily by a person skilled in the art from the disclosures in Documents 1 and 2.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06511

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO,00/52158,A [E,X]	08 September 2000 (08.09.2000)	28 February 2000 (28.02.2000)	01 March 1999 (01.03.1999)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

When only a desired property is specified it is commonly difficult to identify which compounds have this property, and therefore, when the description does not describe any objective trait such as a chemical structure for identifying active ingredients, the process of obtaining the active ingredients needed to carry out the invention involves preparing and screening an infinite number of substances, which exceeds the capacity for trial and error expected of a person skilled in the art. Therefore such a description does not disclose the invention sufficiently clearly or fully to enable a person skilled in the art to carry it out.

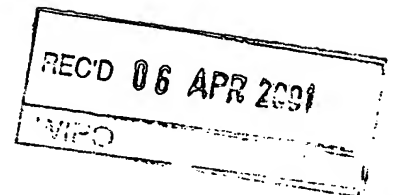
This applies to the description of the present application, because although it describes a method for screening compounds described in Claim 3, for identifying compounds which promote p21/Cip1 activity, suppress the degradation of said protein or promote the expression of the gene for said protein, it does not give any trait such as a chemical structure, and such a trait was not easily deducible by a person skilled in the art at the time of filing the application. Therefore, a person skilled in the art cannot appreciate what active ingredients are included within Claim 3, and carrying out the invention would entail a capacity for trial and error greater than can be expected of a person skilled in the art, in order to prepare and screen an infinite number of compounds.

Therefore, the description does not disclose the invention described in Claim 3 sufficiently clearly or fully to enable a person skilled in the art to carry it out.



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 C1-109PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06511	国際出願日 (日.月.年) 22.09.00	優先日 (日.月.年) 22.09.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl. C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47, A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15		
出願人 (氏名又は名称) 宮坂 信之		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.09.00	国際予備審査報告を作成した日 23.03.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	9735
	六笠 紀子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448		





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: WO, 97/27297, A (MITOTIX INC.) 31.7月.1997(31.07.97)  
&JP, 11-509739, A &US, 5672508, A &AU, 700847, B &AU, 1747397, A  
&CA, 2242960, A &EP, 877804, A

引用文献2: Harper, J. W. et al, "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases."  
Cell(1993) Vol. 75, No. 4, p805-816

## 請求の範囲 1-8

引用文献1には、p21/Cip1等のサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白質の融合蛋白質をリュウマチ関節炎等の炎症疾患の治療に用いることが記載されている。

引用文献2には、p21/Cip1がサイクリン依存性キナーゼを阻害すること、及び、p21/Cip1のDNA配列及びアミノ酸配列が記載されている。

ここで、引用文献1に記載されたようにサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白質をリュウマチ関節炎、つまり滑膜組織の炎症を抑制するために用いることは当業者が容易に想到し得たものと認められ、この際、引用文献2に記載されたp21/Cip1蛋白質、または該蛋白質をコードするDNAを用いること、p21/Cip1蛋白質を増加させる化合物をスクリーニングすることは当業者が適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至8に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。



VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/52158, A 「E, X」	08. 09. 00	28. 02. 00	01. 03. 99

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--



## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物自体を把握することは困難であるため、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが記載されていない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物を製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものであり、当業者が発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを本願明細書についてみると、請求の範囲 3 に記載の化合物について、p 21 / C i p 1 活性を促進、該蛋白質の分解を抑制あるいは該蛋白質の遺伝子の発現を促進する化合物を識別するためのスクリーニング方法は記載されているものの、化合物の化学構造等の手がかりが記載されておらず、かつ、それが出願時に当業者に推認できたものとも認められないので、請求の範囲 3 に包含される有効成分を当業者が理解できず、発明の実施にあたり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。

したがって、発明の詳細な説明は、請求の範囲 3 に係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。





## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 C1-109PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06511	国際出願日 (日.月.年) 22.09.00	優先日 (日.月.年) 22.09.99
出願人(氏名又は名称) 宮坂 信之		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47,  
A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02,  
A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47,  
A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02,  
A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/27297, A (MITOTIX INC.) 31. 7月. 1997 (31. 07. 97) &JP, 11-509739, A &US, 5672508, A &AU, 700847, B &AU, 1747397, A &CA, 2242960, A &EP, 877804, A	1-8
Y	WO, 98/56806, A1 (UNIV CALIFORNIA) 17. 12月. 1998 (17. 12. 98) &AU, 9881421, A	1-8
Y	Harper, J. W. et al, "The p21 Cdk-interacting protein Cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell (1993) Vol. 75, No. 4, p805-816	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/52158, A1 (CELL GENESYS, INC.) 8. 9月. 2000 (08. 09. 00) ファミリーなし	1 - 8
P, X	Yoshinori, N. et al, "Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 gene into the joints" Arthritis & Rheumatism, (Sep. 1999) 42 (9 SUPPL.) pS107	1 - 8
A	WO, 97/42949, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 20. 11月. 1997 (20. 11. 97) &AU, 9730594, A &US, 5849733, A	1 - 8



## 明細書

p21<sup>Cip1</sup> リウマチ治療剤技術分野

本発明は、慢性関節リウマチ炎症を抑制するための分子およびそのスクリーニングに関する。

背景技術

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、多数の関節の滑膜炎症を特徴とする。罹患した滑膜組織は、活性化マクロファージ、線維芽細胞、Tリンパ球および Bリンパ球を含んでいる。局所で産生される IL (interleukin; インターロイキン)-1 $\beta$ 、TNF (tumor necrosis factor; 腫瘍壊死因子)- $\alpha$ 、および IL-6 のような炎症性サイトカインに反応して滑膜線維芽細胞は増殖し、組織分解酵素を放出する (Arend, W.P. and J.M. Dayer, 1995, Arthritis Rheum. 38:151-160; Feldmann, M. et al., 1996, Cell 85:307-310)。その結果生じたパンヌスと呼ばれる過形成滑膜が、罹患関節の軟骨や骨を非可逆的に破壊する。

従来の抗リウマチ薬や最近開発された生物試薬のほとんどは、RA に関係する炎症性メディエータの抑制を主なねらいとしている。生物試薬のほとんどは、TNF- $\alpha$ 、IL-1 または IL-6 のような炎症性サイトカインを中和することを目的としている (Elliott, M.J. et al., 1994, Lancet. 344:1105-1110; Moreland, L.W. et al., 1997, N. Engl. J. Med. 337:141-147; Campion, G.V. et al., 1996, Arthritis Rheum. 39:1092-1101; Arend, W.P. et al., 1998, Annu. Rev. Immunol. 16:27-55; Yoshizaki, K. et al., 1998, Springer Semin. Immunopathol. 20:247-259)。例えば代表的な薬剤としては、ヒドロキシクロロキン、d-ペニシラミン、金、スルファサラジン、および免疫抑制剤メトトレキサートなどの抗リウマチ薬が挙げら

れる。これらの薬剤については、その抗リウマチ作用に必要な標的分子は明確に知られていないものの、炎症の過程を抑制していると考えられている (Conaghan, P.G. et al., 1997, *Curr. Opinion Rheumatol.* 9:183-190)。これに対して、レフルノマイド (leflunomide)、シクロスポリンA、および FK506などの新しく開発された薬剤は、リウマチ滑膜炎に関与する免疫担当細胞の活性化に必要な細胞内分子を阻害する。TNF- $\alpha$ アンタゴニスト (remicadeやinfliximab) は滑膜細胞により放出される炎症メディエーターを中和する。多くの患者はこれらの薬剤に良好な反応を示すが、患者により耐性を示したり疾患寛解期以後において効果が低下することがある。さらに、長期にわたって疾患の進行を食い止める効果についてはほとんど証明されていない。炎症を調節する経路は複雑でリダンダンシーが存在するため、ある炎症メディエーターを抑制すると他のメディエーターが活性化するものと予想される。従って、こういった従来の治療法では最終的に関節破壊を阻止できないことが危惧される。これに対し本発明者らは、サイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) と呼ばれる細胞周期抑制蛋白を利用して、滑膜線維芽細胞そのものの増殖を直接阻害することにより破壊性の滑膜過形成を予防する研究を行ってきた。

CDKIは、それぞれ3～4個のメンバーを含むINK4ファミリーおよびCip/Kipファミリーからなる (Sherr, C.J. and J.M. Roberts., 1995, *Genes Dev.* 9:1149-1163)。個々のCDKIの発現は個別に調節されていることから、それぞれが細胞周期の制御において独自の役割を果たしていることが示唆されている。INK4ファミリーに属するp16<sup>INK4a</sup>は、サイクリンDに結合して、サイクリンDがサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) またはCDK6と触媒的に活性なキナーゼ複合体を形成できないようにする。このようにp16<sup>INK4a</sup>は、G<sub>1</sub>/S移行期で細胞周期を阻害する (Lukas, J. et al., 1995, *Nature* 375:503-506; Koh, J. et al., 1995, *Nature* 375:506-510; Serrano, M., 1997, *Exp. Cell Res.* 237:7-13)。Cip/Kipファミリーに属するp21<sup>Cip1</sup>は、多様なサイクリン/CDK複合体を阻害する (Harper, J.W. et al., 1993, *Cell*



75:805-816; Xiong, Y. et al., 1993, Nature 366:701-704)。p21<sup>Cip1</sup> は、DNAポリメラーゼ $\delta$ を活性化する PCNA (proliferating cell nuclear antigens; 増殖性細胞核抗原) にも結合してこれを不活化する (Flores-Rozas, H. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:8655-8659; Nakanishi, M. et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:17060-17063; Waga, S. et al., 1994, Nature 369:574-578; Li, R. et al., 1994, Nature 371:534-537)。このように、p21<sup>Cip1</sup> は細胞周期の様々な段階でサイクリン/CDK複合体のキナーゼ活性を不活化し、同時にDNA複製を阻害する。

本発明者らはこれまでに、CDKIの発現をリウマチの滑膜組織において調べている (Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5:760-767)。それらは、核内分子のグループに属する。本発明者らは、慢性関節リウマチの滑膜組織に由来するリウマチ滑膜線維芽細胞 (rheumatoid synovial fibroblasts; RSFs) が *in vivo* ではCDKI p16<sup>INK4a</sup> を発現しないが、*in vitro* で線維芽細胞の増殖を阻害すると p16<sup>INK4a</sup> が容易に発現することを見出した。p16<sup>INK4a</sup> の誘導は慢性関節リウマチの滑膜線維芽細胞に特異的に認められた。このことから本発明者らは、アデノウイルスを用いてp16<sup>INK4a</sup> 遺伝子をアジュバント関節炎 (AA) のラットの関節に局所的に移入する実験を行った。この治療により、滑膜過形成および関連する関節炎の他の病態を抑制することに成功した (Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5:760-767)。p16<sup>INK4a</sup> 誘導による関節炎の治療は、従来の抗リウマチ薬や最近開発された生物試薬に十分に匹敵するものであった。

一方、p21<sup>Cip1</sup> は、p16<sup>INK4a</sup> とは異なるファミリーに属するCDKIである。p21<sup>Cip1</sup> も p16<sup>INK4a</sup> と同様、リウマチの滑膜組織に由来する線維芽細胞中で *in vivo* では発現しないが、*in vitro* で線維芽細胞の増殖を阻害すると発現が誘導される。しかしp21<sup>Cip1</sup> の誘導は、p16<sup>INK4a</sup> とは異なり、非リウマチ起源の線維芽細胞にも認められた (Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5:760-767)。また、p21<sup>Cip1</sup> は p16<sup>INK4a</sup> と比べ、サイクリン依存性キナーゼのすべてを阻害する。p21<sup>Cip1</sup> の強制発現もまた、正常細胞や癌細胞の細胞周期をG1期で停止させる (Dimri, G.P. et al.,

1996, *Mol. Cell. Biol.* 16: 2987-2997)。p16<sup>INK4a</sup> 蛋白質のレベルが、老化に伴い次第に上昇し高レベルのまま蓄積されるのとは対照的に、線維芽細胞における p21<sup>Cip1</sup> の発現レベルは、細胞分裂の増加と共に上昇するが細胞が老化すると共に減少する (Tahara, H. et al., 1995, *Oncogene* 10: 835-840)。p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現が老化の誘導に対してより直接的に影響を与えていると考えられる (Alcorta, D.A. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13742-13747) のに対し、p21<sup>Cip1</sup> の生物機能はより複雑であり、ある状況下では、p21<sup>Cip1</sup> はサイクリンおよびCDKの活性型キナーゼ複合体の形成を促進し、細胞周期を停止させるよりもむしろ進行させるように働く (LaBaer, J. et al., 1997, *Genes Dev.* 11: 847-862)。p21<sup>Cip1</sup> の N末端ドメインはCDK/サイクリン複合体と相互作用する一方、C末端ドメインは、DNA複製や修復に必須なDNAポリメラーゼ $\delta$ のサブユニットの1つであるPCNAと結合して阻害を起す (Li, R. et al., 1994, *Nature* 371: 534-537)。また、p21<sup>Cip1</sup> の発現は、p300/CBPコアクチベーターとNF- $\kappa$ Bとの複合体に結合するサイクリンE/CDK2を阻害して、NF- $\kappa$ B依存性の遺伝子発現を増強する (Perkins, N.D. et al., 1997, *Science* 275: 523-527)。さらに、ある種の細胞株においては、p21<sup>Cip1</sup> の強制発現はアポトーシスによる細胞死を誘導する (Tsao, Y.P. et al., 1999, *J. Virol.* 73: 4983-4990; Matsushita, H. et al., 1998, *Hypertension* 31: 493-498; Kondo, Y. et al., 1997, *Exp. Cell Res.* 236: 51-56; Sheikh, M.S. et al., 1995, *Oncogene* 11: 1899-1905)。さらに、キナーゼ活性の阻害以外の生物学的作用も p16<sup>INK4a</sup> と p21<sup>Cip1</sup> では異なっている (LaBaer, J. et al., 1997, *Genes Dev.* 11: 847-862; Li, R. et al., 1994, *Nature* 371: 534-537; Xiong, Y. et al., 1993, *Nature* 366: 701-704)。p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の破壊がマウスモデルにおいて癌の頻発をもたらすことも、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の破壊の結果とは異なっている (Serrano, M. et al., 1996, *Cell* 85: 27-37)。このように、構造的にもp16<sup>INK4a</sup> とは区別され、またその発現様式や細胞周期の阻害様式もp16<sup>INK4a</sup> とは異なるp21<sup>Cip1</sup> が、慢性関節リウマチに対する治療効果を有するかどうかは知られていなかった。

### 発明の開示

本発明は、炎症性滑膜組織においてp21<sup>Cip1</sup> タンパク質の発現を上昇させることにより抗炎症作用が得られるという知見に基づくものであり、その目的は、滑膜細胞またはその周辺において、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の発現や機能を促進することにより、滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制することにある。より詳しくは、本発明は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子、および該タンパク質の活性や存在量を増加させる化合物の利用、並びにこれら分子を含む医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の活性や存在量を増加させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明者らは、慢性リウマチ関節炎 (RA) の動物モデルであるマウスのコラーゲン誘発関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA) を用い、マウスの炎症性滑膜組織に p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子または p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を強制的に発現させた場合の治療効果を調べる実験を行った。このモデルは、ラットのアジュバント関節炎 (adjuvant arthritis; AA) と同様にヒトRAとの顕著な類似性を示す (Courtenay, J.S. et al., 1980, Nature 283:666-668; Wooley, P.H. et al., 1981, J. Exp. Med. 154:688-700; Holmdahl, R. et al., 1988, Lab. Invest. 58:53-60)。この実験により本発明者らは、p16<sup>INK4a</sup> ばかりでなくp21<sup>Cip1</sup> の遺伝子移入により抗関節炎作用が発揮されることを見出した。遺伝子移入により滑膜線維芽細胞が増殖した結果であるパンヌス形成は有意に抑制された。また、軟骨または骨の破壊も認めなかった。さらに、滑膜組織への単核球の浸潤も同様に抑制された。関節炎が発症した後も抗関節炎作用は明白であった。

本発明者らは、p21<sup>Cip1</sup> または p16<sup>INK4a</sup> の誘導によって滑膜細胞は増殖刺激に対して不応性となるばかりでなく、何らかの抗炎症作用を発揮する可能性があると推測した。これを確かめるため、CIA関節における炎症性サイトカインの発現を調

べた。CIAでは、RAと同様に、関節の炎症と軟骨の破壊は、罹患関節におけるIL-1およびTNF- $\alpha$ に依存する。実際にこれらのサイトカインのいずれかに対するモノクローナル抗体 (mAb) を投与すると、関節炎は改善する (Piguet, P.F. et al., 1992, Immunology 77:510-514; Williams, R.O. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9784-9788; Geiger, T. et al., 1993, Clin. Exp. Rheumatol. 11:515-522; Van den Berg, W.B. et al., 1994, Clin. Exp. Immunol. 95:237-243; Thorbecke, G.J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:7375-7379)。RT-PCRおよび免疫組織化学分析によりこれらのサイトカインの発現を調べた結果、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子またはp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を導入した関節では、サイトカインの発現が有意に抑制されていることが明らかになった。

リウマチ滑膜線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験では、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の強制発現は、アポトーシスによる細胞死を誘導することなく、導入細胞の増殖を阻害することが判明した。さらに本発明者らは、ラットのアジュバント関節炎 (AA) モデルを用いて、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子治療の効果を検証した。その結果、CIAモデルで見られたのと同様に、AAラットにおいても、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の関節内への導入は有意な治療効果を示し、*in vivo* および *in vitro* における効果は、いずれも p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子治療に匹敵することが確かめられた。罹患関節組織における滑膜の肥厚、単核球の浸潤、パンヌス形成、および軟骨破壊は、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の投与群では有意に抑制されており、臨床的にも組織学的にも、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子による遺伝子治療の効果は明白であった。また、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を導入した関節の滑膜組織におけるPCNA発現細胞の数は減少しており、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子治療が *in vivo* においても実際に 細胞増殖を抑制していることが確認された。

これらの結果から本発明者らは、リウマチの滑膜組織におけるCDKI遺伝子の発現の誘導、特にp21<sup>Cip1</sup> の誘導が、RA治療の有効な戦略となりうること、そしてCDKIの異所発現が滑膜の過増殖を防止するのみならず、罹患関節における炎症誘導環境をも緩和することを見出した。また、これらの知見は、p16<sup>INK4a</sup> またはp21<sup>Cip1</sup> の

発現を選択的に促進する合成化合物等がRAに対する治療試薬としても作用しうることを示唆している。滑膜細胞の異常増殖や滑膜の炎症を制御し得るこのような化合物は、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質を標的とすることにより効率的にスクリーニングすることができる。また、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質やp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子、並びにこのようなスクリーニングにより得られた化合物には、滑膜細胞の異常増殖および／または炎症に起因するRA等の疾患の予防や治療への応用が期待される。

本発明は、以上の知見に基づくものであり、より詳しくは、

(1) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 蛋白質、

(2) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 蛋白質をコードするDNA、

(3) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の化合物、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 活性を促進する化合物、

(b) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 蛋白質の分解を抑制する化合物、

(c) 内因性サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進する化合物、

(4) (1) に記載のタンパク質、(2) に記載のDNA、または (3) に記載の化合物を有効成分とする、慢性関節リウマチの予防または治療のための医薬組成物、

(5) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングす

る方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(6) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21<sup>Cip1</sup> タンパク質量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該p21<sup>Cip1</sup> タンパク質量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(7) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を発現する細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の転写産物量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の転写産物量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを含む細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) レポーター活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、を提供するものである。

本発明は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いるp21<sup>Cip1</sup> タンパク質および該タンパク質をコードするDNAを提供する。本発明における「滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる」には、滑膜組織（もしくは細胞）の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬としての利用および患者における滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための医薬としての利用が含まれる。炎症性サイトカインとしては、例えば、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6が挙げられる。また、本発明における「滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる」には、滑膜の増生、パニヌス形成および侵襲、単核球などの免疫細胞の関節組織への浸潤、ならびに関節における軟骨若しくは骨の破壊などを含む、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現により引き起こされる疾患症状を緩和するための使用が含まれる。

本発明において、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いるp21<sup>Cip1</sup> タンパク質は、天然のタンパク質であっても、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質であってもよい。これらタンパク質は、公知の蛋白質精製技術または遺伝

子工学的手法で調製することができる。即ち、天然のタンパク質は、例えば、p21<sup>Cip1</sup>タンパク質の部分ペプチドに対するの抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、p21<sup>Cip1</sup>タンパク質発現の高い組織または細胞、例えば、HeLa細胞または継代培養を続けた線維芽細胞から単離し、調製することが可能である。また、組換えタンパク質は、例えば、p21<sup>Cip1</sup>タンパク質をコードするDNA (Harper, J.W. et al., 1993, Cell 75, 805-816、El-Deiry, W.S. et al., 1993, Cell 75, 817-825 (GenBank Ac. No. U03106)、Noda, A. et al., 1994, Exp Cell Res 211, 90-98) で形質転換した細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌 (*E. coli*) が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3 (Invitrogen社) やpEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL社) などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」(Invitrogen社) などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1 (Pharmacia社)、「QIAexpress system」(Qiagen社) などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP(ベーリンガーマンハイム社)やSuperFect (Qiagen社) を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など公知の方法を用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

なお、当業者であれば、公知の方法、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位



特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, H. J. (1987) *Methods in Enzymol.*, 154: 350-367)、Kunkel法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) などの方法を利用して、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の活性や安定性などを高める等のため、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および／または挿入を容易に行うことができる。このような改変p21<sup>Cip1</sup> タンパク質も本発明に用いることが可能である。

滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いるp21<sup>Cip1</sup> タンパク質をコードするDNAとしては、cDNAであってもゲノムDNAであってもよい。p21<sup>Cip1</sup> cDNAおよびp21<sup>Cip1</sup> ゲノムDNAについては、文献 (Harper, J. W. et al., 1993, *Cell* 75, 805-816、El-Deiry, W. S. et al., 1993, *Cell* 75, 817-825 (GenBank Ac. No. U03106)、Noda, A. et al., 1994, *Exp. Cell Res.* 211, 90-98) に配列が開示されている。

p21<sup>Cip1</sup> cDNAおよびp21<sup>Cip1</sup> ゲノムDNAは、上記の開示されている配列情報を基にオリゴヌクレオチド (通常、15～50塩基) を合成し、これをプライマーとして、p21<sup>Cip1</sup> が発現している組織または細胞由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行なうことにより増幅し、調製することができる。また、上記の開示されている配列の一部を有するDNA断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーション法やコロニーハイブリダイゼーション法により、cDNAライブラリーやゲノムライブラリーをスクリーニングすることによってもp21<sup>Cip1</sup> cDNAおよびp21<sup>Cip1</sup> ゲノムDNAを調製することができる。cDNAライブラリーとしては、例えばヒトHeLa細胞由来cDNAライブラリーを用いることができる。また、cDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーは、市販品 (CLONTECH社) を用いることもできる。以上のポリメラーゼ連鎖反応やハイブリダイゼーション法は、文献 (Sambrook et al., *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Lab. Press)) 等の実験書に記載されている一般的な方法に従って行なうことができる。ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA断片やハイブリダイゼーション法によりスクリーニングされたDNA断片は、適当な

プラスミドDNAなどにサブクローニングし、発現実験などに用いることができる。

また、本発明においては、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の活性（サイクリン依存性キナーゼ阻害活性およびPCNA阻害活性など）を促進する化合物、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の分解を抑制する化合物、およびp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進する化合物を用いることも可能である。実施例に示すように、関節への局所的なp21<sup>Cip1</sup> タンパク質の発現が、抗関節炎作用を示すことが見出された。このことから、関節、特に滑膜組織においてp21<sup>Cip1</sup> タンパク質の存在量や機能を高めることにより、その異常増殖を抑制することができると考えられる。

例えば、p21<sup>Cip1</sup> 発現はDNA損傷に反応してp53転写因子によって、一過性ではあるが直ちに誘導される (Dulic, V. et al., 1994, Cell. 76:1013-1023; El-Deiry, W.S. et al., 1994, Cancer Res. 54:1169-1174)。また、高密度培養または低血清培地のような多様な増殖抑制条件下でも、p53非依存的にp21<sup>Cip1</sup> 発現が誘導される。また、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子はいくつかの細胞株において血清、増殖因子、および IL-6 によっても誘導される (Gartel, A. L. and Tyner, A. L., 1999, Exp. Cell Res. 246: 280-289; Bellido, T. et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:21137-21144)。様々なヒト細胞株においてp21<sup>Cip1</sup> を誘導する多くの化合物が既に同定されている (Barboule, N. et al., 1997, Oncogene 15: 2867-2875; Sheikh, M. S. et al., 1994, Oncogene 9: 3407-3415; Gorospe, M. et al., 1999, Gene Express. 7: 377-385)。それらの中には、ヒストン脱アセチル化阻害剤である酪酸や Trichostatin A、また、12-O-テトラデカノイルフォルボル-13-アセテート、コレカルシフェロール、レチノイン酸、ミモシン、およびオカダ酸が含まれる (Nakano, K. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 22199-22206; Sowa, Y. et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 241, 142-150; Alpan, R.S. and A.B. Pardee., 1996, Cell Growth Different. 7:893-901; Jiang, H. et al., 1994, Oncogene 9:3397-3406; Steinman, R. A. et al., 1994, Oncogene 9:3389-3396)。したが

って、細胞内のp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進するこれらの化合物は、本発明において好適に用いられ得る。さらに、p21<sup>Cip1</sup> の誘導は、ファイアースタイン(Firestein)と共同研究者ら (Firestein, G. S. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 10895-10900; Tak, P. P. et al., 1999, Arthritis Rheum. 42: 948-953) によって報告された、リウマチ性滑膜組織におけるp53の異常発現を相補する可能性もある。

ところで、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を促進する化合物を調製するためには、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質に被検化合物を接触させて、そのサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を増加させる化合物を選択すれば良い。即ち、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を促進する化合物は、

(a) p21<sup>Cip1</sup> タンパク質に、被検試料を接触させる工程、(b) p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を検出する工程、および(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の該活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングすることが可能である。

被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させるp21<sup>Cip1</sup> タンパク質は、例えば、精製したタンパク質であっても、担体に結合させた形態であってもよい。また、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させても良い。

p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性は、例えば、サイクリン/CDKによるヒストンのリン酸化活性を測定することにより検出することができる (Matsushime, H. et al., 1994, Mol. Cell. Biol., 14, 2066-2076)。

p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の分解を抑制する化合物を調製するためには、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質に被検化合物を接触させて、その後のp21<sup>Cip1</sup> タンパク質量を検出し、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質量の減少を抑制する化合物選択すれば良い。即ち、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の

分解を抑制する化合物は、(a) p21<sup>Cip1</sup> タンパク質に、被検試料を接触させる工程、(b) p21<sup>Cip1</sup> タンパク質量を検出する工程、および (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングすることが可能である。

被検試料としては、上記スクリーニング方法と同様に、特に制限はない。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質であっても、担体に結合させた形態であってもよい。また、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させても良い。p21<sup>Cip1</sup> タンパク質の存在量の検出は、例えば、ウェスタンブロッティング法により検出することができる。具体的な方法の一例としては、まず、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させ、その後、該細胞を溶解し、これをSDS-PAGEに供する。SDS-PAGE後、ゲル上で泳動させたタンパク質をニトロセルロース膜などに転写する。該膜にp21<sup>Cip1</sup> タンパク質に対する抗体を接触させ、さらに標識した二次抗体を接触させて、該膜上に存在するp21<sup>Cip1</sup> タンパク質の存在量を検出する。被検試料を接触させなかった細胞を用いた場合（対照）と比較して、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質量を増加させる化合物を選択すれば良い。

p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進する化合物を調製するためには、内因性のp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させ、該遺伝子の発現を増加させる化合物を選択すれば良い。即ち、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進する化合物は、(a) 内因性のp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を発現する細胞に、被検試料を接触させる工程、(b) p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の転写産物量を検出する工程、および (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の転写産物量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングすることが可能である。

被検試料としては、上記スクリーニングと同様に、特に制限はない。また、内因性のp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を発現する細胞としては、例えば、滑膜組織由来の線維芽細胞などの細胞を好適に用いることができるがこれに限定されない。p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子

の転写産物量の検出は、ノーザンブロットィング法やRT-PCR法などの当業者に公知の手法を用いて行なうことができる。

また、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現制御領域の活性化を指標とする方法によって、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進する化合物をスクリーニングすることもできる。効率的なスクリーニングのために、レポーター遺伝子を用いることも可能である。このスクリーニングは、(a) p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを含む細胞に、被検試料を接触させる工程、(b) レポーター活性を検出する工程、および(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。

本発明のスクリーニング法においては、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを構築する。ここで「機能的に結合された」とは、発現制御領域の活性化に応答して、その下流に結合されたレポーター遺伝子が発現しうるように、発現制御領域とレポーター遺伝子が結合していることを指す。レポーター遺伝子としては、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子などを用いることができる。

次いで、これを哺乳動物細胞に導入し、被検試料を該細胞株に接触させ、レポーター活性を検出する。被検試料としては、上記スクリーニング方法と同様に、特に制限はない。レポーター活性の検出は、レポーター遺伝子の種類に応じて公知の方法で行なうことができる。その結果、被検試料を接触させない細胞におけるレポーター活性と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択することにより、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進し、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する化合物をスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現をレポーター活性を指標として検出するため、先のノーザンブロットィング

やRT-PCR解析などの直接的な検出方法を利用したスクリーニングと比較して簡便であるという特徴を有する。

なお、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現制御領域(プロモーター)については、文献(El-Deiry, W. S. et al., 1995, Cancer Res., 55 (13), 2910-2919 (GenBank Ac. No. U24170)、Evans, S. C. et al. (GenBank Ac. No. U50603)) に記載されている。また、該発現制御領域を用いた転写制御実験については、文献 (Nakano, K. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 22199-22206、Sowa, Y. et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 241, 142-150) に記載されている。

p21<sup>Cip1</sup> タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、および上記スクリーニングにより単離される化合物は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬として、また、滑膜組織の異常増殖や炎症が関与する疾患（特に慢性関節リウマチ）の予防や治療のための医薬組成物として利用することができる。滑膜組織の異常増殖および／または炎症が関与する疾患としては、慢性関節リウマチ以外にも、例えば、若年性関節リウマチや関節炎を伴う他のリウマチ性疾患および骨関節症などが考えられる。

滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬としてp21<sup>Cip1</sup> タンパク質を用いる場合には、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質は、例えば、マイクロインジェクションなどの方法により滑膜細胞に導入することができる。

p21<sup>Cip1</sup> タンパク質をコードするDNAを滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬として用いる場合、該DNAの発現を滑膜細胞内で保証し得るベクターに該DNAを挿入してこれを滑膜細胞に導入することができる。滑膜細胞へのベクターの導入法としては、例えば、直接注入法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソーム法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなど

の当業者に公知の方法で行うことが可能である。また、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いて導入することもできる。

上記スクリーニングにより単離される化合物を滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬として用いる場合、該化合物の形態に応じて、例えば、マイクロインジェクション法（タンパク質などの高分子化合物の場合）、リン酸カルシウム法などの遺伝子導入法（化合物が遺伝子の場合）、滑膜細胞の培養培地への添加などの手法により、該細胞に導入することができる。*in vivo* においては関節内注入などにより滑膜組織に投与することができる。遺伝子は例えば公知のベクター系を用いて投与され得る。

また、p21<sup>Cip1</sup> タンパク質や上記スクリーニングにより得られる化合物を滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための医薬組成物として用いる場合には、これらを直接患者に投与（例えば関節内への局所投与）する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロ

ースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HC0-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

p21<sup>Cip1</sup> は本来の細胞の代謝回転に必須である細胞周期を阻害する可能性があるため、それらの全身発現は重篤な副作用を誘発する可能性がある。また、p21<sup>Cip1</sup> の発現を上昇させる化合物の全身投与も、同様に副作用を有する可能性がある。従って、これらの投与においては、その作用が関節等の患部に限局されるようになされることが好ましい。そのためには、関節への局所投与や、ドラッグデリバリーシステムにより作用を患部に限定することが考えられる。



例えば、本発明の薬剤の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、成人（体重60kgとして）においては、一般的には、1日あたり約0.01から1000mg、好ましくは約0.1から100mg、より好ましくは約1.0から50mgである。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、一般的には、1日あたり約1 $\mu$ gから100mg、好ましくは約0.01から30mg、より好ましくは約0.1から20mg程度を静脈注射により投与する。

p21<sup>Cip1</sup>タンパク質をコードするDNAを患者の滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための医薬として用いる場合（遺伝子治療用途の場合）、p21<sup>Cip1</sup>タンパク質をコードするDNAは、適当なベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、あるいはプラスミドDNAなどに組み込み、患者に投与する。ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合は、炎症反応の惹起が低減されたアデノウイルスのバリエーション等を用いることが望ましい（Steinwaerder, D.S. et al., 1999, J. Virol. 73: 9303-9313）。投与方法としては、例えば患部への局所投与等の当業者に公知の方法から好ましい方法を適宜選択して行なうことができる。投与方法としては、インビボ（*in vivo*）法が好適に用いられる。また、遺伝子導入細胞からのパラクリン効果を期待する場合においては、エクスビボ法も用いられ得る。投与において、リン脂質などをミセル化して作製したリポソームに遺伝子を封入することにより、組織移行性、組織吸収性を高めることもできる。またカチオン性の脂質を加え、遺伝子DNAと複合体を形成させることにより、組織移行性、組織吸収性を高めることも可能である。これにより、患者の滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制することができると考えられる。

図1は、慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞の増殖に及ぼすp16<sup>INK4a</sup> およびp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子移入の効果を示す図である。RA患者滑膜組織から採取したヒト滑膜線維芽細胞を、様々な力価のAxCap16、AxCap21、またはAxCALacZアデノウイルスに感染させ、10%FCS(A)または10 ng/ml PDGF + 1 %FCS(B)で刺激した。 [<sup>3</sup>H]-TdRの取り込みは、感染させないで増殖刺激を行った対照の滑膜線維芽細胞の取り込みと比較して示す。p16<sup>INK4a</sup> (●) またはp21<sup>Cip1</sup> (△) の遺伝子移入は、ウイルス力価依存的に細胞増殖を阻害したが、lacZの遺伝子移入(□)は細胞増殖を阻害しなかった。各点とバーは平均±SEMを表す。

図2は、CIAの進行に及ぼすp16<sup>INK4a</sup> およびp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子治療の効果を示す図である。CIAのマウスをAxCap16 (●)、AxCap21 (△)、AxCALacZ (◇) アデノウイルス、または生理食塩液 (■) によって、関節炎発症後2回(矢印、21日と31日)(A、BおよびC)、または1回限り(矢印、31日)(D) 処置した。動物の足首の幅(A)、足の容積(B)そして疾患のスコア(CおよびD)を図示した日に測定した。グラフ上の各点はマウス7匹の平均値±SEMを表す。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 (p16<sup>INK4a</sup> (AxCap16) 対生理食塩液)、#P<0.05、##P<0.01、###P<0.001 (p21<sup>Cip1</sup> (AxCap21) 対生理食塩液)。

図3は、マウスのCIAに及ぼすp16<sup>INK4a</sup> およびp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子治療の効果を示す写真である。CIAマウスをアデノウイルス AxCap16、AxCap21、AxCALacZ、または生理食塩液で2回処置した。2回目の免疫の3週間後に、関節炎関節の放射線検査(A~E)と組織病理検査(F~J)を行った。AとF、正常な足首関節；BとG、生理食塩液処置CIA足首関節；CとH、AxCALacZ処置CIA足首関節；DとI、AxCap16処置CIA足首関節；EとJ、AxCap21処置CIA足首関節。F~J、観察時倍率 35倍。

図4は、CIA関節における炎症性サイトカインmRNAの発現に及ぼすp16<sup>INK4a</sup> およびp21<sup>Cip1</sup> *in vivo* 遺伝子導入の効果を示す写真である。関節をアデノウイルス AxCap16、AxCap21、AxCALacZ、または生理食塩液で2回処置した。2回目の免疫の3週間後に1群あたりマウス4匹から採取した後足の滑膜組織におけるIL-1β、

IL-6、TNF- $\alpha$ 、およびGAPDH mRNAの発現を調べた。各RT-PCRアッセイ産物の予想される大きさを括弧内に示す。レーン1～4、生理食塩液処置足首関節；レーン5～8、AxCALacZ処置足首関節；レーン9～12、AxCap16処置足首関節；レーン13～16、AxCap21処置足首関節。

図5は、CIA関節の滑膜組織におけるIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の免疫組織化学分析を示す写真である。アデノウイルス AxCap16 (G～I)、AxCap21 (J～L)、AxCALacZ (D～F)、または生理食塩液(A～C)で2回処置したCIA膝関節の滑膜組織を採取して、連続凍結切片を作製した。それらを抗-TNF- $\alpha$  Ab (A、D、GおよびJ)、IL-1 $\beta$  Ab (B、E、HおよびK)、または正常ウサギ血清 (NRS) (C、F、IおよびL) で処理した。結合した抗体をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼとその基質 DAB で可視化した。サポニン処理のため、IL-1 $\beta$  およびTNF- $\alpha$  の染色は主に核周辺に観察された。観察時の倍率は140倍。

図6は、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子導入によるリウマチ滑膜線維芽細胞 (RSF) の増殖阻害を示す図である。図示したMOIのアデノウイルス Ax1w1 または AxCap21 を感染させた RSF を 10% FBS で刺激した。AxCap21 を感染させたRSFによる <sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを、対照に用いた Ax1w1 を感染させた RSF との相対値で示した。100 MOI の感染で統計的有意差が見られた (p<0.01)。

図7は、p21<sup>Cip1</sup> を強制発現させたRSFのアポトーシスアッセイの結果を示す写真である。A、B、C、および D: 核の Hoechst33258 染色。N-acetylsphingosine 処理したRSFでは、アポトーシスを起した細胞に典型的に見られる核の凝集および断片化が示されている (A)。AxCap21処理RSF (B) および Ax1w1処理RSF (C) では、未処理のRSF (D) と同様にアポトーシスの徴候は観察されない。(観察時の倍率  $\times$  400)。アポトーシスを起した細胞の定量については実施例を参照のこと。E: 細胞DNAのアガロースゲル電気泳動。未処理RSF (レーン2)、AxCap21 感染後 2日 (レーン3) および4日 (レーン4)、ならびに Ax1w1 感染後 2日 (レーン5) および4日 (レーン6) のRSFから調製した全細胞DNAを解析した。UV-処理したHL-60細胞の

DNAを同様に分画して、典型的なヌクレオソームDNAラダーを示した（レーン7）。レーン1はDNA分子量マーカー（ $\phi$ X174 HaeIII 切断物）である。

図8は、アジュバント関節炎（AA）ラットの関節膨脹における  $p21^{Cip1}$  遺伝子導入の効果を示す図である。AAラットの膝関節にアデノウイルス AxCAp21 (◆) または AxCALacZ (◇) を関節内注入する処理を行った。各点およびバーは6匹のラットの平均±SEMを示す。矢印は遺伝子導入のタイミングを表す。遺伝子導入は3回（A）または1回（B）行った。アスタリスクは2つのグループ間で統計的有意差があることを示す ( $p<0.05$ )。

図9は、AAの組織病理学に及ぼす  $p21^{Cip1}$  遺伝子治療の効果を示す写真である。関節炎関節に3回の遺伝子導入を行い、免疫感作の4週間後に組織学的検査を行った。膝蓋靭帯周辺の滑膜組織の切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。A: 正常関節、B: 生理食塩水で処理した関節、C: AxCALacZ処理した関節、D: AxCAp21処理した関節。p: 膝蓋骨、s: 滑膜組織、f: 大腿骨頭、t: 膝蓋腱。

図10は、 $p21^{Cip1}$  遺伝子導入処理した膝関節の組織学的測定結果を示す図である。AxCAp21 ( $p21^{Cip1}$ ) または AxCALacZ (LacZ) で処理した関節の滑膜厚 (A)、単核球の浸潤 (B)、パンプス侵襲 (C)、および軟骨厚 (D) を顕微鏡で観察して測定した。点とバーは6匹のラットの結果の平均±SEMを表す (A, B, C)。パネルCの点はラット個体ごとの組織学的スコアを表す。全ての測定において統計的有意差が見られた。

図11は、 $p21^{Cip1}$  遺伝子導入処理した膝関節の滑膜組織におけるPCNAの発現を示す写真および図である。AxCAp21 (A) または AxCALacZ (B) で処理した関節の滑膜組織におけるPCNAの発現を、抗PCNAモノクローナル抗体を用いて検出した。PCNA LIを算出し、平均±SEMをカラムとバーで示した (C)。統計的有意差が検出された ( $p<0.01$ )。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお培養リウマチ滑膜線維芽細胞 (rheumatoid synovial fibroblasts; RSFs) は、日本医大病院、東京都立墨東病院または府中病院で、総関節置換手術または滑膜切除術を受けた慢性関節リウマチ患者のリウマチ滑膜組織から調製した。外科技法の前に患者から同意書を得た。慢性関節リウマチ (RA) の診断は、全米リウマチ学会の基準に従って行った (Arnett, F. C. et al., 1988, *Arthritis Rheum.* 31:315-324)。滑膜線維芽細胞は文献の記述通りに培養した (Taniguchi, K. et al., 1999, *Nature Med.* 5:760-767)。また、実施例 2 における統計分析はスタットビュー 4.5J ソフトウェア (アバカス・コンセプツ、バークレイ、カリフォルニア州) によって行った。CIA マウスの足首の幅および足の容積の統計学による差は、スチューデントの t 検定によって評価し、疾患のスコアはマン・ホイットニーの U (Mann-Whitney U) 検定によって評価した (実施例 2)。また実施例 4 ~ 7 における統計解析はスタットビュー 5.0J ソフトウェア (SAS インターナショナル (SAS Institute Inc.), カリー, ノースカロライナ州) により行った。培養 RSF の  $^3\text{H}$ -チミジン取りこみ、ならびに AxCap21 または AxCALacZ で処理した関節の膝幅、軟骨厚および滑膜厚、および PCNA-LI の統計解析は 2 群の t 検定で比較した (実施例 6 および 7)。パンヌス侵襲スコアは Mann-Whitney U 検定によって評価した (実施例 7)。アデノウイルスを感染させた RSF のアポトーシスの割合は t 検定で比較した (実施例 5)。

〔実施例 1〕 p16<sup>INK4a</sup> および p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子のアデノウイルスによる移入は滑膜細胞の増殖を阻害する

p16<sup>INK4a</sup> または p21<sup>Cip1</sup> の強制発現が滑膜細胞に及ぼす抗増殖作用を、ヒト滑膜線維芽細胞を用いて調べた。リウマチの滑膜組織から調製した滑膜線維芽細胞 (RSF) に、p16<sup>INK4a</sup>、p21<sup>Cip1</sup>、または大腸菌 lacZ をそれぞれ含む、組換え型アデノウイルス AxCap16、AxCap21、または AxCALacZ を感染させた。ヒト p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子およびヒト p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を含む複製欠損アデノウイルス (それぞれ AxCap16

および AxCap21) は、寺田および伊藤両博士 (東京医科歯科大学、東京、日本) から供与された (Terada, Y. et al., 1997, J. Am. Soc. Nephrol. 8:51-60)。lacZ 遺伝子をコードする組換え型アデノウイルス (AxCALacZ) は、斉藤博士 (東京大学、東京、日本) から供与された (Kanegae, Y. et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3816-3821)。高力価組換え型アデノウイルスは、293細胞での増幅によって調製し、塩化セシウム密度勾配遠心によって精製した (Kanegae, Y. et al., 1994, Jpn. J. Med. Sci. Biol. 47:157-166)。それらの増殖を10%FCSまたは10 ng/ml 血小板由来増殖因子 (PDGF) で刺激し、 $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みの測定により細胞増殖アッセイを行った。組換え型アデノウイルスの *in vitro* 遺伝子移入およびアデノウイルス感染細胞による  $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みの測定は、他の文献に記述されている (Terada, Y. et al., 1997, J. Am. Soc. Nephrol. 8:51-60)。

滑膜細胞にAxCap16またはAxCap21を感染させると、その増殖はウイルスの力価に依存して抑制された (図1)。AxCALacZでは作用を認めなかった。マウスNIH3T3線維芽細胞を同じウイルスに感染させ、同様に刺激した場合にも、同様の増殖抑制作用を認めた。

〔実施例2〕 p16<sup>INK4a</sup> およびp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子誘導がCIAの病態に及ぼす効果

実施例1と同じ組み合わせのアデノウイルスを用いて、*in vivo* でコラーゲン誘発関節炎 (CIA) マウスの滑膜組織においてp16<sup>INK4a</sup>、p21<sup>Cip1</sup>、またはLacZ遺伝子を誘導した。

CIAの誘導方法を以下に示す。雄性DBA/1Jマウスを日本チャールス・リバー・ラボラトリーズ社 (東京、日本) から購入して、東京医科歯科大学動物実験施設で収容した。ウシII型コラーゲン (コラーゲン・リサーチ・センター、東京、日本) を0.1M 酢酸に 2mg/mlで溶解して等量のプロイント完全アジュバント (イアトロロン社、東京、日本) と乳化した。8週齢のマウスの尾根部に免疫原100  $\mu$ lを皮内注射した。3週間後、マウスに同じ抗原を皮下注射した。2回目の免疫から10日以内に関節炎を発症した。

関節への *in vivo* 遺伝子移入は2回目の免疫と同じ日と10日後、または2回目の免疫の10日後のみのいずれかに行った。すなわち、AxCap16、AxCap21、および AxCALacZ アデノウイルスを生理食塩液中で  $10^8$  粒子/ $\mu$ l の濃度で調製し、それぞれのマウスの足首の関節（関節あたり  $5 \mu$ l）および膝関節（関節あたり  $10 \mu$ l）に両側の関節内注射を行い、そして足根関節（関節あたり  $5 \mu$ l）に両側の関節周囲注射を同時に行った。生理食塩液のみの注射を対照とした。

CIA疾患の重症度の評価は、各後肢の関節炎の重症度を以下のように採点することにより行った：0、正常；1、足首関節または足先に限局した紅斑と軽度の腫脹；2、足首から足中央部に及ぶ紅斑と軽度の腫脹；3、足首から中足骨関節に及ぶ紅斑と重度の腫脹；4、関節腫脹を伴う強直性変形 (Rosloniec, E.F. et al., 1996, Collagen-induced arthritis, *In Current Protocols in Immunology*, J.E. Coligan et al. eds., John Wiley & Sons, Inc., NY., 15.5.1-24)。各マウスの疾患スコアは、2本の後肢のスコアの合計として表した。スコア採点は2人の採点者によって盲検的に行った。足首の幅はマイクロメーター（オザキ製造、東京、日本）で測定し、足の容積はTK101体積変動測定計（ユニコム社、千葉、日本）で測定した。後肢のX線写真は、SR0-M30 X-線装置（ソフロン社、東京、日本）を用いて3.5 mAで1分間X線フィルム（富士写真フィルム、東京、日本）への直接露光によって得た。

アデノウイルス AxCap16, AxCap21, および AxCALacZ をマウスの足首の関節に注射し、これらのマウスからRNAを採取し、逆転写酵素によりcDNAに逆転写した。これらのcDNAを鋳型に、特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った結果、移入した遺伝子のmRNAは、対応する遺伝子を持つ組換え型アデノウイルスを投与した関節に特異的に発現されることが確認された。疾患の経過において、足首の幅、足の容積、そして疾患のスコアを評価したところ、生理食塩液または *lacZ* 遺伝子を移入した場合と比較して、 $p16^{INK4a}$  または  $p21^{Cip1}$  遺伝子を移入すると、関節炎は有意に改善することが判明した（図2A、BおよびC）。膝関節の腫脹も、これらのCDKI

処置マウスでは抑制されることが判明した。疾患のスコアの差は、最初の遺伝子移入後11日目に統計学的有意に達した ( $P < 0.05$ )。疾患の発病は、生理食塩液処置マウスと比較すると、AxCAp16処置マウスでは平均で2.4日、そしてAxCAp21処置マウスでは3.4日遅れた。

関節炎発病後のCDKI遺伝子移入の治療効果は、2回目の免疫の10日後、関節の腫脹が明らかになり始めた時期に、CIAマウスを処置することによって調べた。AxCAp16またはAxCAp21のいずれかによる処置は、関節炎が既に発症した後でもその進行を有意に抑制した (図2D)。

2回目の免疫の3週間後の足首関節の放射線検査により、CDKI処置マウスの関節では、組織の腫脹および骨のびらんが顕著に抑制されていることが明らかになった (図3A~E)。同時に、処置した足首について組織学的に検査した (図3F~J)。組織学的検査では、2回目の免疫の3週間後に採取したCIAマウスの後足を10%リン酸緩衝ホルマリン (pH 7.4) で固定し、10%EDTAで石灰質を除き、パラフィンに包埋し、作製した切片 (4  $\mu$ m) をヘマトキシリン・エオシンで染色して観察した。AxCAp16またはAxCAp21で処置した関節では、AxCALacZまたは生理食塩液で処置した関節と比較して滑膜過形成が大きく減少した (図3IおよびJ)。単核球の滑膜組織への浸潤やパンヌスの形成は減少し、軟骨または骨の破壊を認めなかった。

本発明者らが調べた臨床所見と組織学的所見の全てにおいて、AxCAp16で処置した関節とAxCAp21で処置した関節の間に有意差を認めなかった。

【実施例3】 CIA罹患関節における炎症性サイトカインの発現に及ぼすp16<sup>INK4a</sup>およびp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子誘導の効果

CIAでは、RAの場合と同様に、滑膜細胞から主として分泌されるTNF- $\alpha$ およびIL-1が、CIAの病理の主な原因である (Piguet, P.F. et al., 1992, Immunology 77:510-514; Williams, R.O. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9784-9788; Wooley, P.H. et al., 1993, J. Immunol. 151:6602-6607; Joosten, L.A.B. et al., 1996, Arthritis Rheum. 39:797-809)。そこで、アデノウイルス



AxCap16、AxCap21、AxCALacZ または生理食塩液で処置した関節炎関節における、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 、IL-6、およびTNF- $\alpha$ の発現を調べた。後足からの滑膜組織を組織病理検査の当日に採取した。これらのサイトカインのmRNA発現レベルを逆転写(RT)-PCRによって分析した。

RT-PCR分析のために、Isogen (日本ジーン、東京、日本) によって、全RNAを関節滑膜組織から抽出した。Superscript II逆転写酵素 (ライフ・テクノロジー社、ガイサースバーグ、メリーランド州) によって相補的DNA (cDNA) を合成し、グルタルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を増幅する場合にはPCR 25 サイクルを行い、ヒトp16<sup>INK4a</sup> およびp21<sup>Cip1</sup>、大腸菌 lacZ、マウスIL-1 $\beta$ 、IL-6 およびTNF- $\alpha$  cDNAを増幅する場合には、PCR 30サイクルを行った。PCRサイクルは94°Cで1分間、58°Cで1分間、および 72°Cで2分間実施した。産物をアガロースゲル電気泳動で分画して、エチジウムブロマイドで染色した。特異的PCRプライマーの核酸配列は以下の通りである：ヒトp16<sup>INK4a</sup>、5'-AAC GCA CCG AAT AGT TAC GG-3' / 配列番号：1 (センス) および5'-GCA TGG TTA CTG CCT CTG GT-3' / 配列番号：2 (アンチセンス)；ヒトp21<sup>Cip1</sup>、5'-ACT GTG ATG CGC TAA TGG C-3' / 配列番号：3 (センス) および5'-ATG GTC TTC CTC TGC TGT CC-3' / 配列番号：4 (アンチセンス)；大腸菌 lacZ、5'-ACT TAA TCG CCT TGC AGC AC-3' / 配列番号：5 (センス) および5'-CAT CTG AAC TTC AGC CTC CA-3' / 配列番号：6 (アンチセンス)；マウスIL-1 $\beta$ 、5'-CTG AAA GCT CTC CAC CTC-3' / 配列番号：7 (センス) および5'-GGT GCT GAT GTA CCA GTT GG-3' / 配列番号：8 (アンチセンス)；マウスIL-6、5'-GAG ACT TCC ATC CAG TTG CC-3' / 配列番号：9 (センス) および5'-TTC TGC AAG TGC ATC ATC G-3' / 配列番号：10 (アンチセンス)；マウスTNF- $\alpha$ 、5'-GCC ACC ACG CTC TTC TG-3' / 配列番号：11 (センス) および5'-ATG GGC TCA TAC CAG GG-3' / 配列番号：12 (アンチセンス)；マウスGAPDH、5'-AAG AAG GTG GTG AAG CAG GC-3' / 配列番号：13 (センス) および5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' / 配列番号：14 (アンチセンス)。

分析の結果、これらのサイトカインmRNAは全て、AxCALacZおよび生理食塩液処置滑膜組織では豊富に検出された(図4)。対照的に、AxCap16またはAxCap21で処置した滑膜組織ではそれらは検出不能であるか、ごく低レベル存在するに過ぎなかった。mRNA量を抽出RNA量で標準化した。GAPDH mRNAは各群の関節から等しく増幅された。

次に、滑膜組織においてIL-1 $\beta$ またはTNF- $\alpha$ を発現する細胞を同定するために免疫組織化学分析を行った。

2回目の免疫の3週間後に採取したCIAマウスの後足の膝関節からの滑膜組織を、オルニチン・カルバミル・トランスフェラーゼ・コンパウンド(ティシューテク;マイルス社、エルクハート、インディアナ州)に包埋して、液体窒素の中で凍結し、-80°Cで保存した。連続凍結切片(8  $\mu$ m)を風乾させて、4%冷リン酸緩衝パラホルムアルデヒド(pH 7.4)で固定し、150 mM NaClおよび0.1%サポニンを含む10 mMトリス塩酸(pH 7.5)で洗浄して、10%正常ヤギ血清と共にインキュベートした。次にそれらをウサギ抗ヒトIL-1 $\beta$ (LP-712;ジェンザイム社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)、ウサギ抗マウスTNF- $\alpha$ 抗体(IP-400;ジェンザイム社)、または正常ウサギ血清と共に4°Cで一晩インキュベートした。それらをビオチン結合ヤギ抗ウサギIgG(サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ、バーミンガム、アラバマ州)と共にインキュベートして、0.3%過酸化水素のメタノール溶液で処理して、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ベクター・ラボラトリーズ、ビュリントン、カリフォルニア州)と共にインキュベートした。結合した抗体を0.5 mg/mlの3,3'-ジアミノベンジジン4塩酸のPBS溶液(pH 7.4)および0.02%過酸化水素によって可視化して、最終的にヘマトキシリンで対比染色した。

AxCALacZまたは生理食塩液で処置した関節では、これらのサイトカインは滑膜の関節腔側の層に強く、また、滑膜組織内部にも認められた(図5A~F)。これとは対照的に、同じ染色技法を行っても、AxCap16およびAxCap21処置関節の滑膜に

におけるIL-1 $\beta$ またはTNF- $\alpha$ の染色は非常に弱かった(図5G~L)。このように、滑膜組織における炎症性サイトカインの遺伝子転写および放出は、CDKI処置関節において著しく抑制されていた。

【実施例4】 p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子導入によるリウマチ滑膜線維芽細胞(RSF)の増殖阻害

上記の組み換えアデノウイルス AxCap21 を用いて、p21<sup>Cip1</sup> の異所発現がRSFの増殖に及ぼす効果を検証した。挿入を持たないアデノウイルス Ax1w1 を理研遺伝子バンク(埼玉県)より購入して対照として用いた。日本医大病院、東京都立墨東病院または府中病院で滑膜切除術または総関節置換手術を受けた5名のリウマチ滑膜炎患者から同意の下で滑膜組織を採取した。患者は全員、全米リウマチ学会(American College of Rheumatology)の基準(Arnett, F.C. et al., 1988, Arthritis & Rheum. 31: 315-324)で慢性関節リウマチ(RA)と診断された。RSFは文献の記載に従って単離し培養した(Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5: 760-767)。

10%FBSを含む培地中でRSFを対数増殖させ、ヒトp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を含むアデノウイルス AxCap21、または挿入遺伝子を持たないアデノウイルス Ax1w1 を感染させた。*in vitro* アデノウイルス感染は以前記載の通りに行った(Terada, Y. et al., 1998, J. Am. Soc. Nephrol. 9: 2235-2243)。感染細胞の全細胞抽出物のウェスタンブロット解析を行ったところ、p21<sup>Cip1</sup> 蛋白質は AxCap21を感染させた細胞で特異的に発現しており、Ax1w1を感染させた細胞では発現は検出されなかった。これらの細胞の増殖を感染24時間後に評価した。細胞増殖は<sup>3</sup>H-チミジンの取りこみにより測定した(Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5: 760-767)。Ax1w1を感染させたRSFの増殖と比較して、AxCap21を感染させたRSFの増殖は有意に抑制されていた。この抑制効果は、感染させるウイルスの力価に依存していた(図6)。

【実施例5】 p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の過剰発現によるRSFのアポトーシスによる細胞死

AxCap21を感染させたRSFで観察された増殖阻害は、p21<sup>Cip1</sup>の異所発現が誘導したアポトーシスに起因する可能性が考えられた。そこで、アデノウイルス AxCap21を感染させたRSF、およびAx1w1を感染させたRSFのアポトーシスによる細胞死を測定した。

$5 \times 10^5$  のRSFに  $5 \times 10^7$  PFU のアデノウイルス AxCap21 または Ax1w1 を MOI 100 で感染させた。同数の細胞を 40ng/ml PDGF (ジェンザイム (Genzyme), ケンブリッジ, マサチューセッツ州) を含む RPMI1640 培地中で、50  $\mu$ M N-acetylsphingosine (和光純薬, 大阪) で処理してアポトーシスを誘導した (Mizushima, N. et al., 1998, Ann. Rheum. Dis. 57: 495-499)。4日後に処理した細胞をトリプシン-EDTA溶液 (免疫学研究所, 群馬) で回収し、1%グルタルアルデヒド/PBSで固定し Hoechst33258 (モレキュラープローブズ (Molecular Probes), ユージーン, オレゴン州) で染色した。アポトーシスを起した細胞を定量するため500個の核を肉眼で観察した。処理細胞からは全細胞DNAを抽出し、DNAの断片化を2%アガロースゲルDNA電気泳動で解析した。

以前報告されているように、RSFは N-acetylsphingosine 処理によりアポトーシスによる細胞死が誘導された (Mizushima, N. et al., 1998, Ann. Rheum. Dis. 57: 495-499)。アポトーシスを起したRSFは、Hoechst33258による染色により核の凝集および断片化などの特徴的な形態変化が観察された (図7A)。RSFを、増殖阻害が起こる濃度のAxCap21 (100 MOI) または同じ濃度の Ax1w1 で処理し、感染4日後に同様の染色を行った (図7Bおよび2C)。これらのRSFを、ウイルス非感染のRSF培養と比較した (図7D)。特徴的な核変化により示されるアポトーシスを起した細胞の割合を、各ウイルス感染に対して3つずつ別々に評価した。その結果、非感染RSF、AxCap21感染RSF、および Ax1w1感染RSFにおけるアポトーシスを起した細胞の頻度に有意な違いは見出されなかった (それぞれ  $0.52 \pm 0.45\%$ 、 $0.69 \pm 0.60\%$ 、 $0.60 \pm 0.67\%$ )。

AxCap21を感染させたRSF、または対照に用いた Ax1w1 を感染させたRSFの核DNA

をアガロースゲル電気泳動で分離した。アポトーシスを起したHL-60細胞のDNAは典型的なヌクレオソームDNAラダーが観察されたが、AxCap21またはAx1w1を感染させたRSFでは断片化したDNAは検出されなかった（図7E）。これらの結果は、RSFにおけるp21<sup>Cip1</sup>の過剰発現は、アポトーシスによる細胞死を誘導しないことを示している。p21<sup>Cip1</sup>遺伝子の強制発現は、アポトーシスによる細胞死を誘導することなくRSFの細胞増殖を阻害することが明らかとなった。

〔実施例6〕 ラットアジュバント関節炎に対するアデノウイルスを介したp21<sup>Cip1</sup>遺伝子導入

6週齢の雄 Lewisラット6匹を、1mgの*M. butyricum*を懸濁した100 $\mu$ lのミネラルオイルで免疫感作しアジュバント関節炎（AA）を誘発させた。これらのラットの右膝にAxCap21を、同じ個体の左膝にAxCALacZを注入する処理を行った。関節内遺伝子導入は、 $1 \times 10^7$  PFUのアデノウイルスを含む生理食塩水50 $\mu$ lを膝関節へ注入して行った。遺伝子導入は1回（感作後7日）または3回（感作後8、15、および22日）行った。疾患を誘導したラットは、経時的に関節炎の程度を観察して臨床スコアを作成した（Eden, W. and Josee, P.A., Adjuvant arthritis in rat. *In*: Current protocols in immunology. New York: John Wiley & Sons; 1996. Supplement 19）。膝関節の幅はマイクロメーターで計測した。臨床観察の最後に、関節を固定して組織学的および免疫組織化学的に解析した。対照実験として生理食塩水を注入したラットも観察した。

実験期間中、膝関節の膨脹が観察された。感作後10日前後で全てのラットで関節炎が発症した。免疫感作後何も処理しないラットでは、感作後20日前後で膝関節幅は最大に達し、その後減少した。減少は関節の線維症と接着する筋肉の萎縮に起因していた。対照のアデノウイルスで処理した膝関節も同様の経過を示した（図8）。これに対し、p21<sup>Cip1</sup>遺伝子導入ラットでは、1回投与または3回投与に関わらず、膝関節の膨脹は有意に抑制された（図8、 $p < 0.05$ ）。1週間ごとに3回の遺伝子導入を繰り返した場合、統計学的に有意な治療効果は実験の全期間に

亘って持続した。このように、p21<sup>Cip1</sup> の関節内への遺伝子導入は *in vivo* においてラットのアジュバント関節炎も寛解させることが示された。遺伝子導入を1回行った場合も関節の膨脹は効果的に抑制されたが、遺伝子導入後2週間で効果は低下した。

【実施例7】 p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子導入によるラットAAの組織病理学的効果

3回の遺伝子導入処理を行ったラットの関節を、最後の遺伝子導入の1週間後に組織学的に解析した。膝関節は10%PBS-ホルマリン固定および脱カルシウム後にパラフィンワックスに包埋した。切片(5 $\mu$ m)はヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。滑膜組織および軟骨の厚さは、脛骨先端への滑膜の接着部分に最も近い部位で計測した。同じ部位の滑膜組織 1.8 $\times 10^{-8}$  m<sup>2</sup> 中の単核球数も計数した。パニヌスの侵襲の程度は、以前の記載に従って評価した(Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5: 760-767)。

正常ラットの膝関節の滑膜組織では、緩い脂肪結合組織に支持された滑膜の裏打ち細胞が1層か2層観察された(図9A)。AxCALacZまたは生理食塩水で処理した関節炎関節では滑膜の顕著な肥厚と単核球の浸潤が認められた。また異常なパニヌス組織の発達と隣接する骨への侵襲が観察された(図9Bおよび4C)。また、罹患関節中の軟骨の変性が見られた。これに対し、AxCAp21で処理した関節の滑膜組織では、滑膜の肥厚および単核球の浸潤は顕著に抑制されていた(図9D)。パニヌス組織による骨破壊も抑制されており、軟骨もよく保存されていた。滑膜厚および軟骨厚を計測し、浸潤した単核球数も計数した(Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5: 760-767)。またパニヌスの侵襲の度合いをスコアで評価した。AxCAp21処理した関節と対照に用いたlacZウイルス(AxCALacZ)で処理した関節におけるこれらの評価は全て、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の導入が関節炎を有意に寛解させることを示している(図10)。

S期の細胞はPCNAを発現する。遺伝子導入後1週間経過した関節炎滑膜組織を免疫組織化学的に解析して、PCNAの発現を調べた。

免疫組織化学解析は、固定した切片 (5 $\mu$ m) を脱パラフィンし、10 $\mu$ M クエン酸ナトリウム (pH 6) 中で5分間マイクロ波で加熱する処理を2回行った。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、10%正常ヤギ血清を含むPBS、および抗PCNAモノクローナル抗体 (pC10, サンタクルズ バイオテック (Santa Cruz Biotech), カリフォルニア州) で1時間インキュベートした。この抗体は p21<sup>Cip1</sup> との結合部位とは異なるPCNAペプチド鎖に結合し、p21<sup>Cip1</sup> のPCNAへの結合が抗体の反応を阻害する可能性は否定されている (Roos, G. et al., 1993, Lab. Invest. 68: 204-210; Chen, J. et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24:1727-1733)。その後、ビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体 (AP181B, ケミコンインターナショナル (Chemicon International Inc.), テメキュラー, カリフォルニア州)、およびストレプトアビジン標識した西洋ワサビペルオキシダーゼ (サザンバイオテクノロジー アソシエーツ (Southern Biotechnology Associates Inc.), バーミンガム, アラバマ州) とインキュベートした。結合した抗体は、0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で発色させた。切片はヘマトキシリンで対比染色を行った。200の滑膜細胞を試験して、全細胞中のPCNA陽性細胞の割合 (PCNAラベリングインデックス; LI) を算出した (Galand, P. and Degraef, C., 1989, Cell & Tiss. Kinet. 22: 383-392)。

PCNA染色陽性の滑膜細胞は、AxCap21処理した関節の滑膜組織よりも、AxCALacZ処理した関節の滑膜組織でより高頻度で見出された (図1 1Aおよび1 1B)。S期の細胞の頻度を反映するPCNAラベリングインデックス (LI) を、3箇所 of 独立の顕微鏡視野で測定した。その結果、AxCALacZ処理した関節に比べ、AxCap21処理した関節の PCNA LI値は有意に低い値を示した (図1 1C)。この結果は、滑膜細胞の細胞周期が、実際に *in vivo* で阻害を受けていることを示している。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および/または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するためのp21<sup>Cip1</sup> タンパク質、該タ

ンパク質をコードするDNA、およびp21<sup>Cip1</sup>タンパク質の機能や存在量を増加させる化合物が提供された。これら分子は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬としての利用が考えられる他、慢性関節リウマチなど、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現に関連する疾患の予防や治療のための医薬組成物としての応用が期待される。



## 請求の範囲

1. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 蛋白質。

2. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 蛋白質をコードするDNA。

3. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の化合物。

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 活性を促進する化合物。

(b) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 蛋白質の分解を抑制する化合物。

(c) 内因性サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現を促進する化合物。

4. 請求項 1 に記載のタンパク質、請求項 2 に記載のDNA、または請求項 3 に記載の化合物を有効成分とする、慢性関節リウマチの予防または治療のための医薬組成物。

5. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup> タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21<sup>Cip1</sup> タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

6. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cipl</sup> タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21<sup>Cipl</sup> タンパク質量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該p21<sup>Cipl</sup> タンパク質量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

7. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cipl</sup> 遺伝子を発現する細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21<sup>Cipl</sup> 遺伝子の転写産物量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該p21<sup>Cipl</sup> 遺伝子の転写産物量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

8. 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cipl</sup> 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを含む細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) レポーター活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、レポーター活性を増加させ

る化合物を選択する工程、を含む方法。



1 / 1 1

図 1

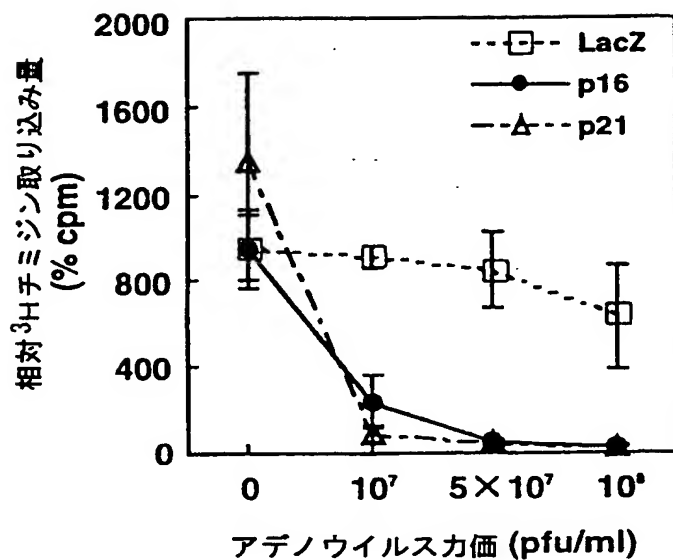
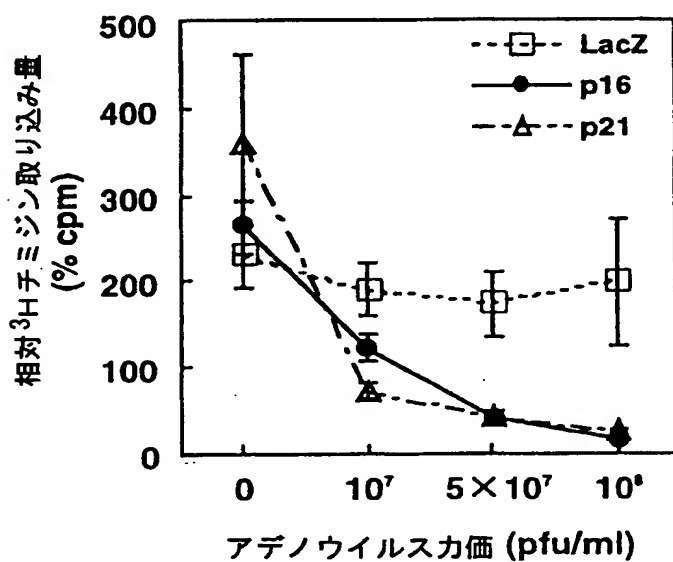
**A****B**



図 2

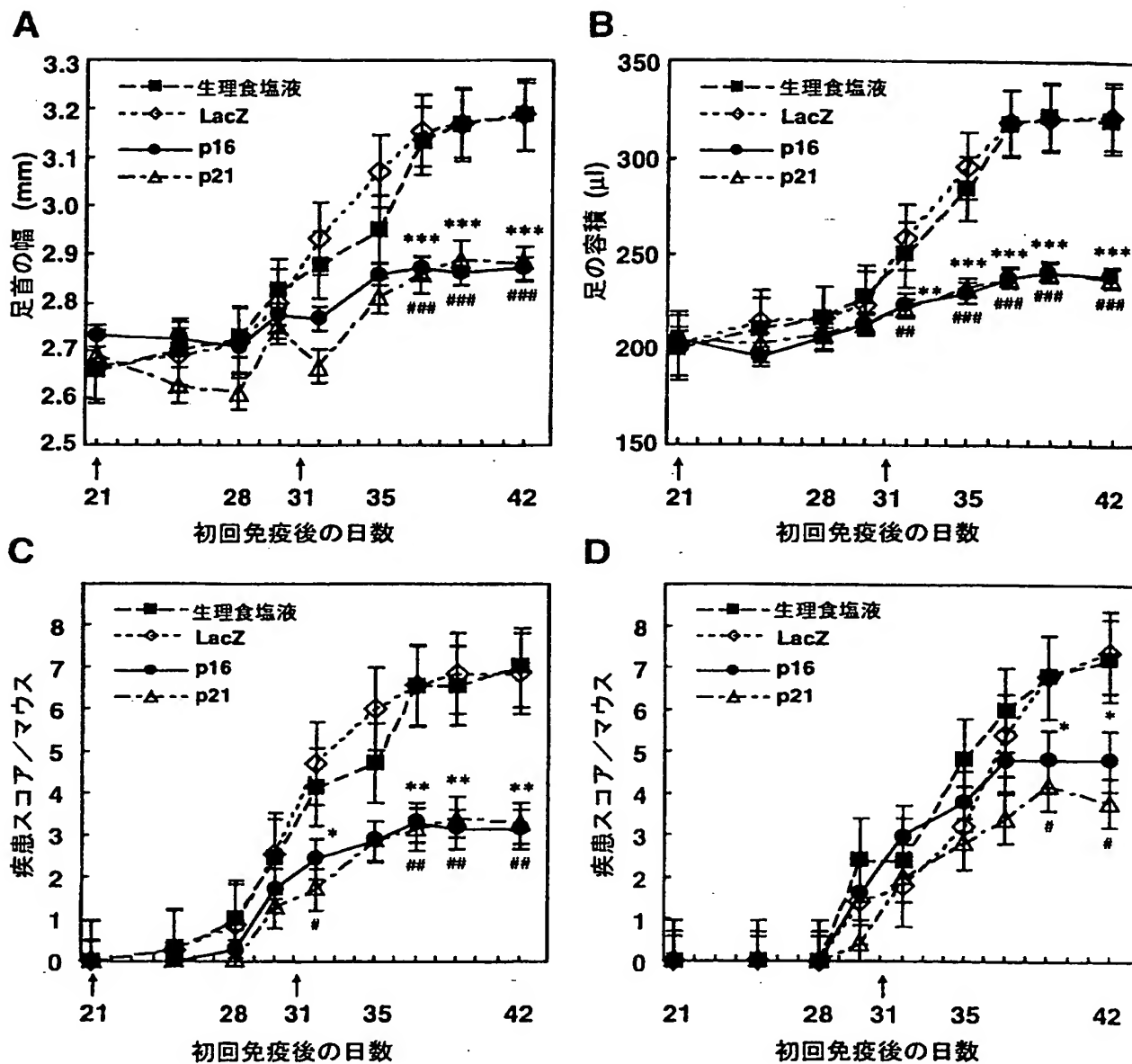
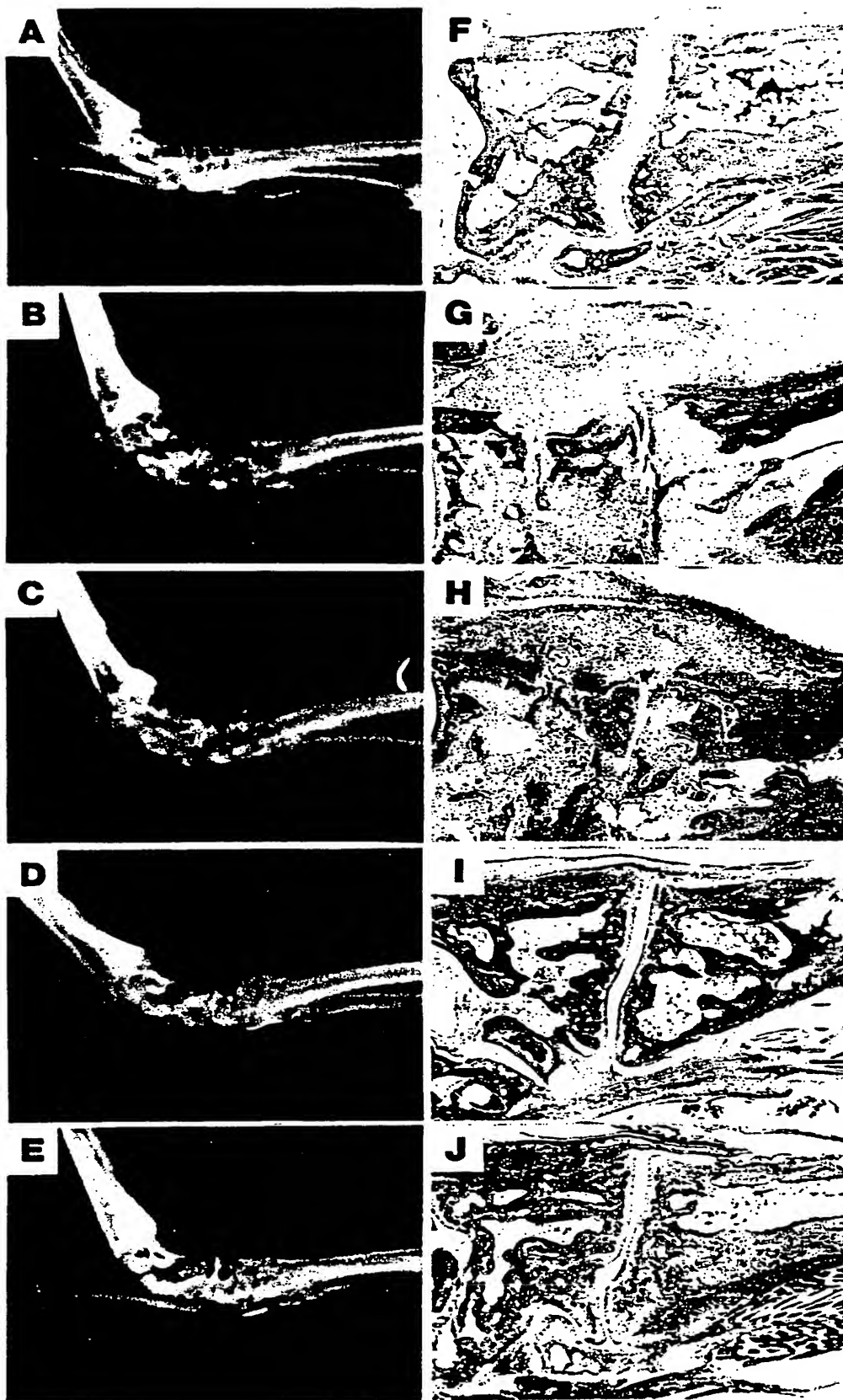






図 3





4 / 1 1

図 4

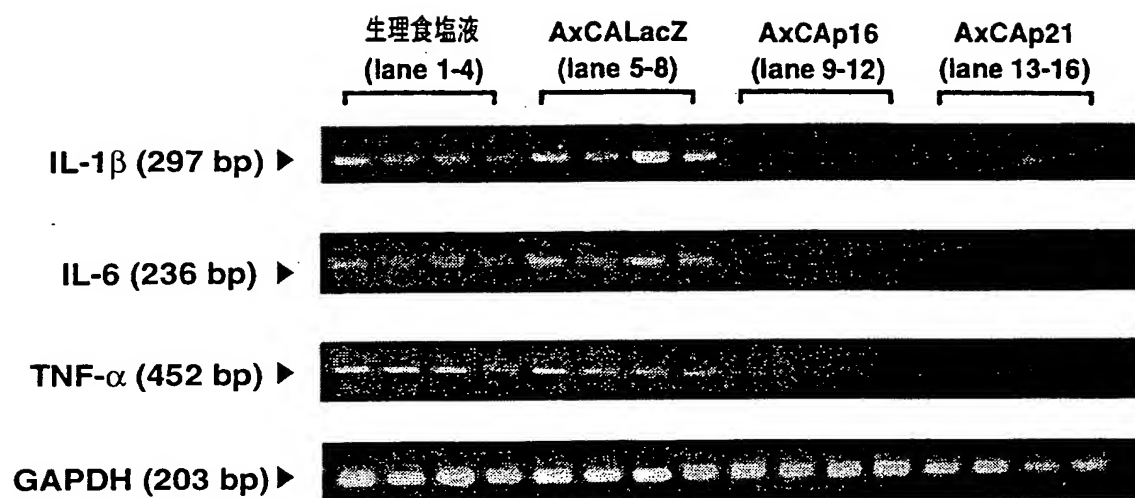
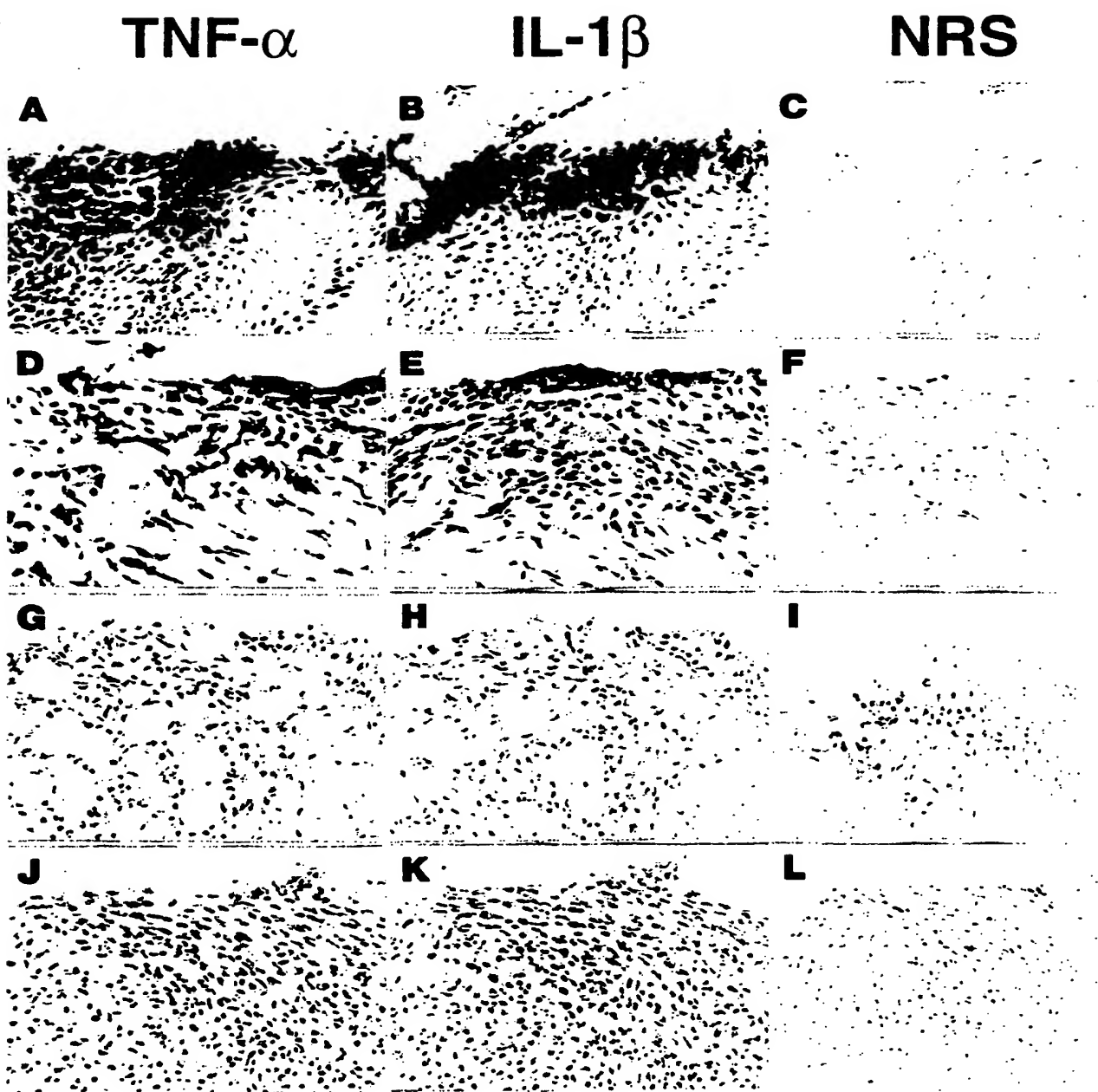




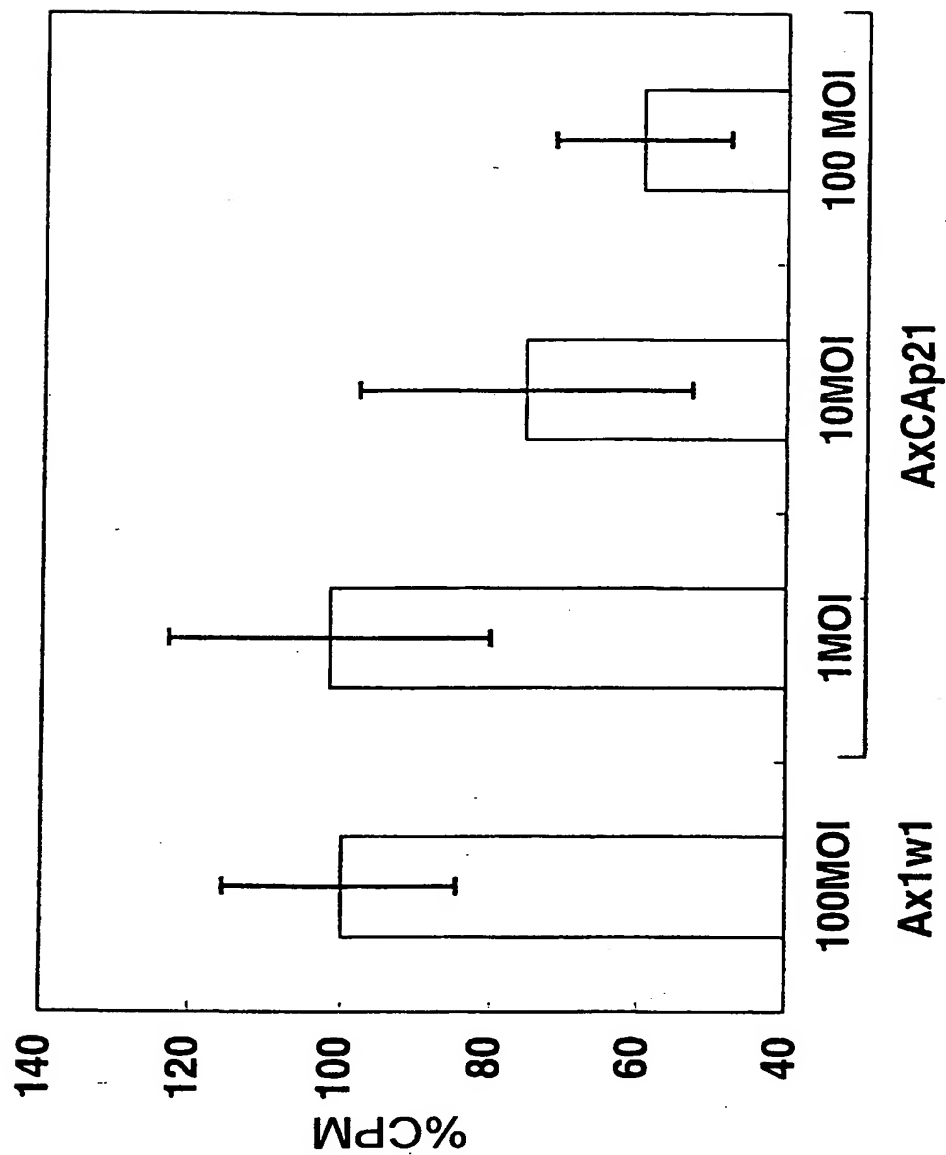
図 5





6 / 11

図 6





•

•

•

•



7 / 11

図 7

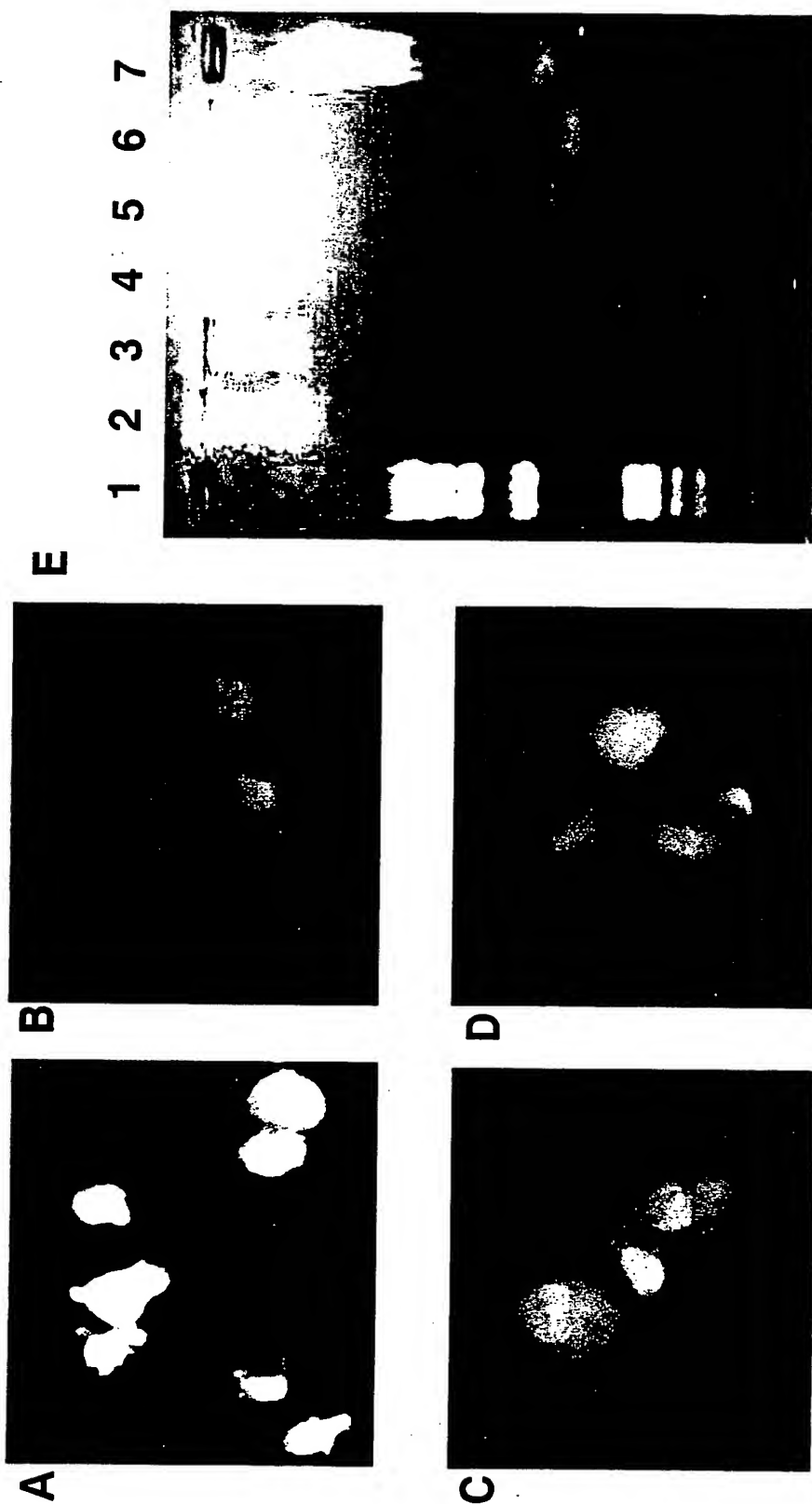




図 8

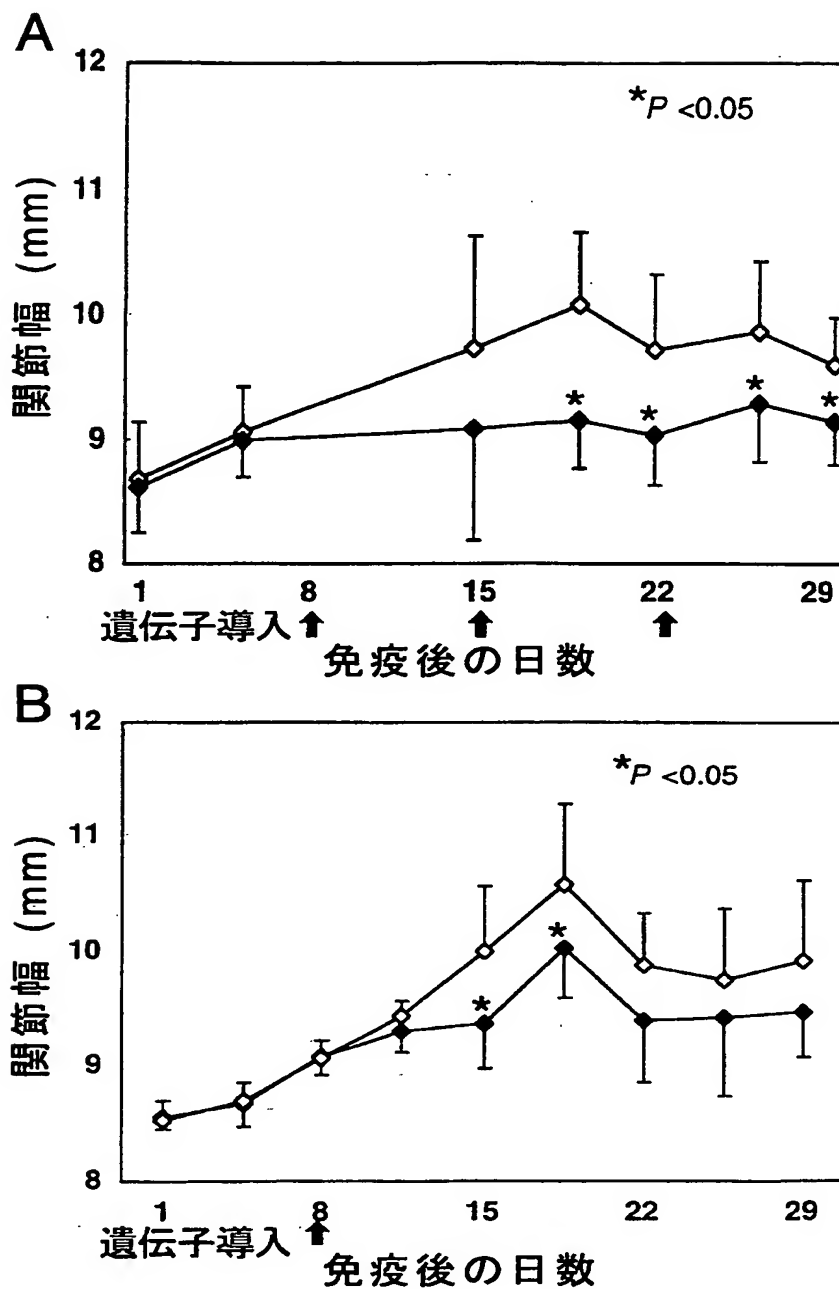




図 9

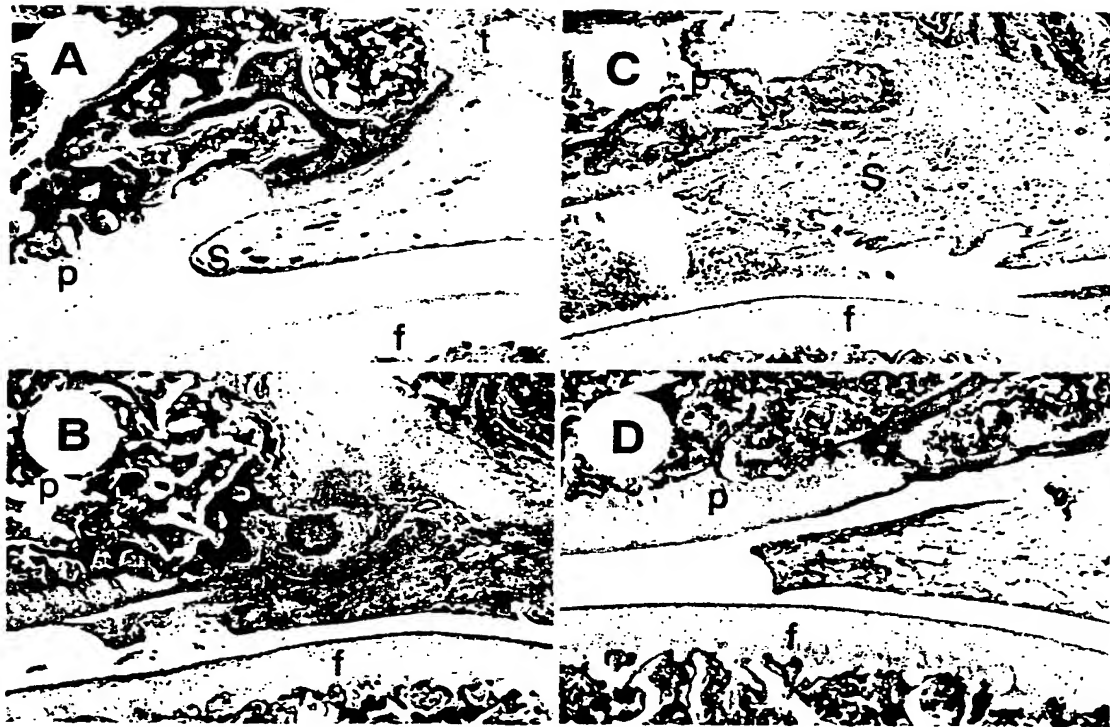
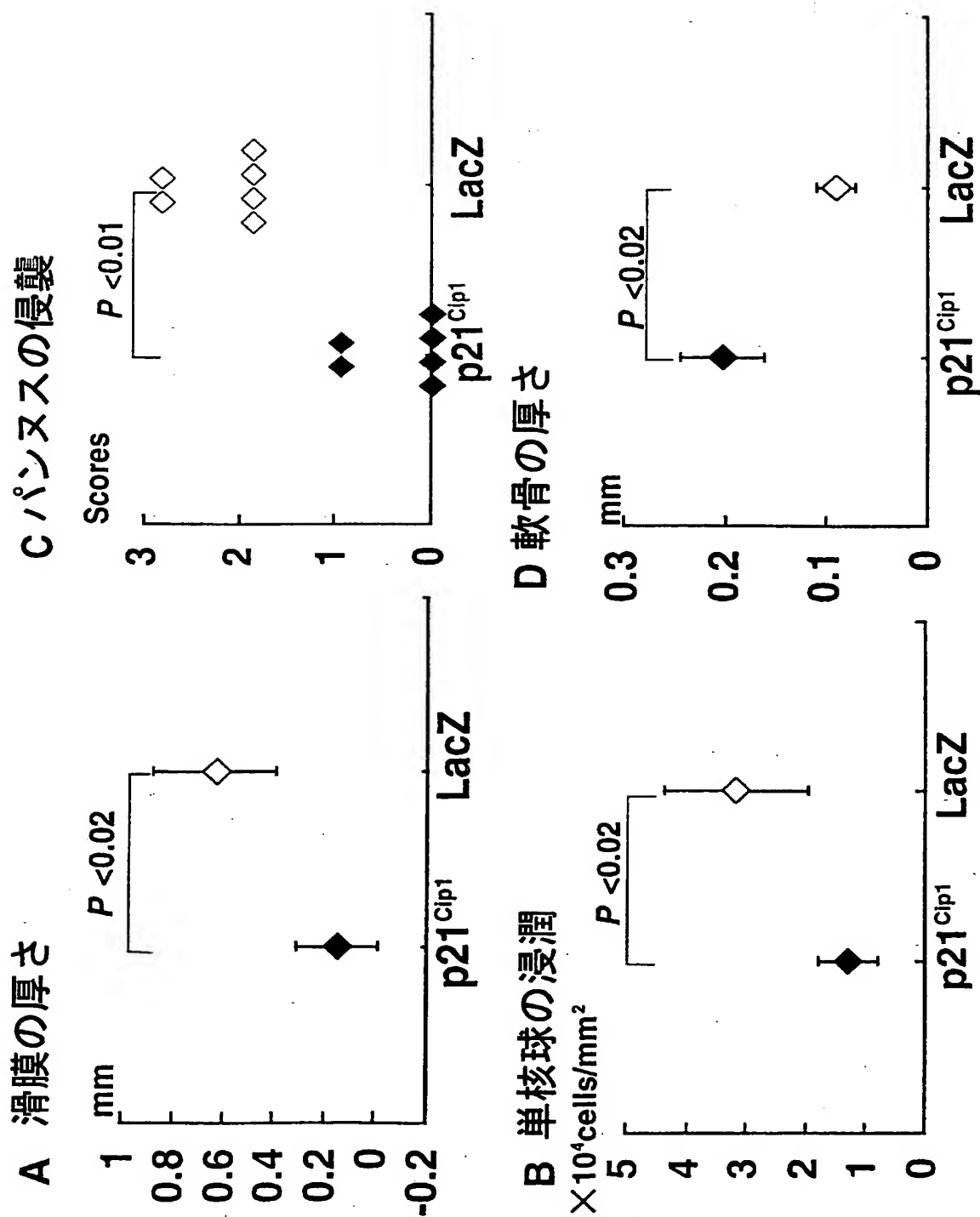




図 10

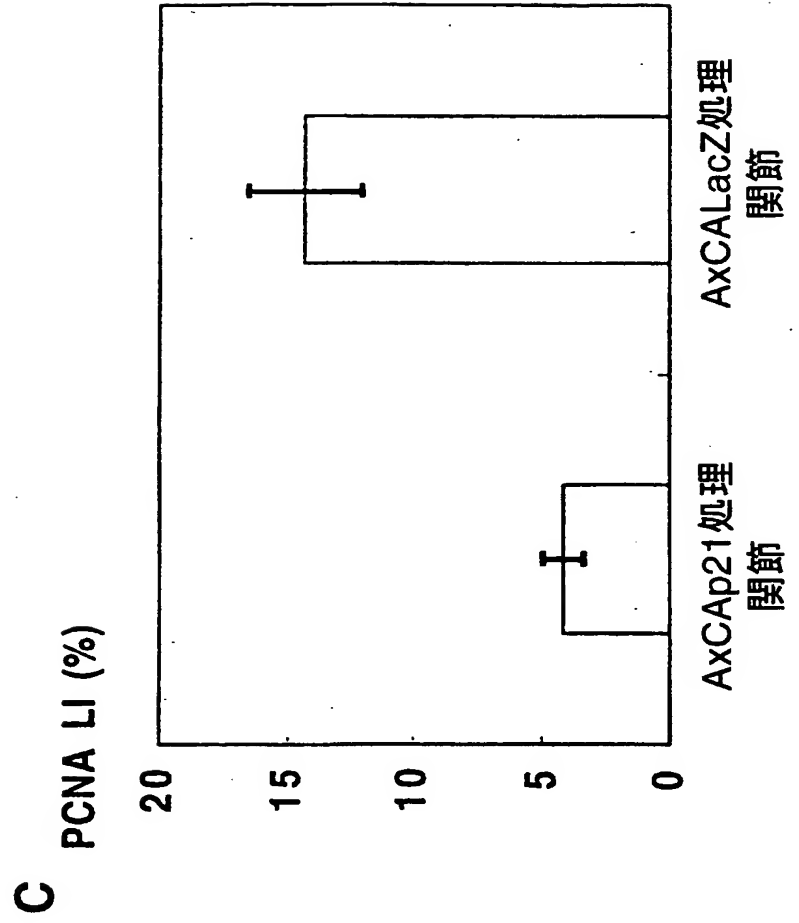






11 / 11

図 11





## SEQUENCE LISTING

<110> MIYASAKA, Nobuyuki  
KOHSAKA, Hitoshi

<120> p21(Cip1) used for treatment of rheumatoid arthritis.

<130> C1-109PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-269579

<151> 1999-09-22

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 1

aacgcaccga atagttacgg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 2

gcatggttac tgcctctggt

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 3

actgtgatgc gctaatggc

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 4

atggtcttcc tctgctgtcc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 5

acttaatcgc cttgcagcac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 6

catctgaact tcagcctcca

20



<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7  
ctgaaagctc tccacctc 18

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 8  
ggtgctgatg taccagttgg 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9  
gagacttcca tccagttgcc 20

<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence





<400> 10  
ttctgcaagt gcatcatcg

19

<210> 11  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 11  
gccaccacgc tcttctg

17

<210> 12  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 12  
atgggctcat accaggg

17

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 13  
aagaaggtgg tgaagcaggc

20

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14

tccaccaccc tggctgta

20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP00/06511

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47,  
A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02,  
A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47,  
A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02,  
A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/27297, A (MITOTIX INC.), 31 July, 1997 (31.07.97) & JP, 11-509739, A & US, 5672508, A & AU, 700847, B & AU, 1747397, A & CA, 2242960, A & EP, 877804, A	1-8
Y	WO, 98/56806, A1 (UNIV CALIFORNIA), 17 December, 1998 (17.12.98) & AU, 9881421, A	1-8
Y	Harper, J. W. et al, "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell(1993) Vol.75, No.4, pp.805-816	1-8
P, X	WO, 00/52158, A1 (CELL GENESYS, INC.), 08 September, 2000 (08.09.00) (Family: none)	1-8
P, X	Yoshinori, N. et al, "Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 gene into the joints" Arthritis & Rheumatism, (Sep.1999) 42 (9 SUPPL.) pS107	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
14 December, 2000 (14.12.00)

Date of mailing of the international search report  
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06511

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO, 97/42949, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY),  20 November, 1997 (20.11.97)  &amp; AU, 9730594, A &amp; US, 5849733, A</p>	<p>1-8</p>

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int.Cl <sup>1</sup> C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47, A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>1</sup> C12N15/12, C12Q1/68, C12N9/12, C07K14/47, A61K45/00, A61K38/17, A61P29/00, A61P19/02, A61P43/00, G01N33/50, G01N33/15		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/27297, A (MITOTIX INC.) 31. 7月. 1997 (31. 07. 97) &JP, 11-509739, A &US, 5672508, A &AU, 700847, B &AU, 1747397, A &CA, 2242960, A &EP, 877804, A	1-8
Y	WO, 98/56806, A1 (UNIV CALIFORNIA) 17. 12月. 1998 (17. 12. 98) &AU, 9881421, A	1-8
Y	Harper, J. W. et al, "The p21 Cdk-interacting protein Cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell (1993) Vol. 75, No. 4, p805-816	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14. 12. 00	国際調査報告の発送日 26.12.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 印	4 B 9 7 3 5
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/52158, A1 (CELL GENESYS, INC.) 8. 9月. 2000 (08. 09. 00) ファミリーなし	1 - 8
P, X	Yoshinori, N. et al, "Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 gene into the joints" Arthritis & Rheumatism, (Sep. 1999) 42 (9 SUPPL.) pS107	1 - 8
A	WO, 97/42949, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 20. 11月. 1997 (20. 11. 97) &AU, 9730594, A &US, 5849733, A	1 - 8